

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA-FÍSICA APLICADA

Sección Departamental de Ciencias de la Alimentación  
Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL)



CIAL



**FRACCIONAMIENTO Y APLICACIONES  
DE EXTRACTOS SUPERCRÍTICOS DE ROMERO**  
*(Rosmarinus Officinalis)*

**GONZALO VICENTE ILLERA**

**Tesis Doctoral**

Madrid, Diciembre 2012



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA-FÍSICA APLICADA

Sección Departamental de Ciencias de la Alimentación  
Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL)

**FRACCIONAMIENTO Y APLICACIONES  
DE EXTRACTOS SUPERCRÍTICOS DE ROMERO**  
*(Rosmarinus Officinalis)*

Memoria presentada por:

**Gonzalo Vicente Illera**

Para optar al grado de

**DOCTOR EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**

Trabajo realizado bajo la dirección de:

**Dra. Mónica Rodríguez García-Risco**

(Universidad Autónoma de Madrid)

**Dra. Tiziana Fornari Reale**

(Universidad Autónoma de Madrid)



**D<sup>a</sup>. Mónica Rodríguez García-Risco, Dra en Ciencias Químicas y Profesora Contratada Doctor de la Universidad Autónoma de Madrid y D<sup>a</sup>. Tiziana Fornari Reale, Dra en Ingeniería Química y Profesora Titular de la Universidad Autónoma de Madrid**

**INFORMAN:**

Que el presente trabajo titulado: “Fraccionamiento y aplicaciones de extractos supercríticos de romero (*Rosmarinus Officinalis*)” y que constituye la memoria que presenta D. Gonzalo Vicente Illera para optar al grado de Doctor en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, ha sido realizado en la Universidad Autónoma de Madrid y en el Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación bajo su dirección.

Y para que así conste firman el presente informe en Madrid a 5 de Diciembre de 2012.

Fdo: Mónica Rodríguez García-Risco

Fdo: Tiziana Fornari Reale



*“La única religión  
El único camino  
El único mandato  
Será el amor”*







## Gracias...

Si algo he aprendido estos años es que lo importante es lo que eres, no los títulos que tienes; lo que haces por los demás, no lo que consigues a costa de los demás. Lo feliz que eres, no lo que tienes.

Por eso, me gustaría dar las gracias:

-A Mónica y Tiziana. Las madres de este trabajo y principales responsables de que hoy se puedan estar leyendo estas líneas. Gracias por vuestra dedicación, esfuerzo, trabajo, flexibilidad, amabilidad, cercanía y compromiso. Gracias por enseñarme todo lo que sé del mundo de la investigación y haber sido muy buenas personas conmigo durante estos años. Y gracias por brindarme la oportunidad de seguir, por lo menos, tres años más con vosotras.

-Al Dr. Guillermo Reglero, por permitirme iniciar mi carrera investigadora en el Grupo de Investigación de Ingredientes Alimentarios Funcionales de la UAM

-A la Dra. M<sup>a</sup> Victoria Moreno Arribas, directora del CIAL, por permitirme disponer de los servicios ofrecidos por el centro.

-A la Dra Ana Ramírez, Susana y Marga, por su continua colaboración y disponibilidad; por a portar un granito de arena muy grande a esta tesis.

-A los Doctores del departamento que me han ayudado. Alex, por su confianza y complicidad en el laboratorio; Montse, por contestar siempre cuando la he necesitado y preocuparse por mí; Diana, por su disponibilidad y calidad cuando hemos trabajado juntos; Pilar, por los momentos compartidos en el PCM.

-Al grupo de investigación Foodomics, en especial a la Dra. Elena Ibáñez y José Antonio Mendiola. Gracias por acogerme en vuestro laboratorio y estar siempre disponibles para ayudar.

-A mis compañeros del laboratorio. Sin vosotros no sería lo mismo venir a trabajar. Gracias a Ali, María, Laila, Bea, Ana, Elena, Juanan, Maika, Erika, David, Inés, Guzmán, Luis, Dani, Víctor y Óscar. A estos dos últimos en especial, amigos desde que empezamos en primero de carrera. Gracias por los momentos vividos estos 9 años ¡Quién nos iba a decir que aquí seguiríamos!

-A la gran familia del J3 Ayllón, por compartir conmigo tanta vida fuera y dentro de los campos de fútbol sala.

-Al Centro Juvenil Paseo y todas las personas que lo forman, por ser un sitio donde se trabaja por un mundo de otra manera. "Lo importante son las personas".

-A mis amigos de toda la vida, que son mi familia. Gracias por todos los momentos vividos, por los viajes que hemos hecho, por las cañas y copas que nos hemos tomado, por crecer juntos. Aunque todavía no sepáis que leches estoy haciendo, sé que siempre estáis ahí.

-A mi familia. A mis hermanos José Luis, Belén y Ángel; cuñados: Carlos y Mónica; sobrinos: Javi, Miriam, Pablo y Óscar; a mis padres. Gracias por darme una vida llena de oportunidades y haberme dado una vida tan feliz. Soy como soy gracias a vosotros.

-A Cris. Por haber tenido la suerte de haberme cruzado en su camino. Gracias por quererme tanto y ser la persona que faltaba en mi vida. Gracias por preocuparte por intentar saber qué es un fluido supercrítico... ¡Por suerte siempre podremos hablar de tu trabajo!

-Por último, a mi abuela María. Decías que no me verías acabar bachillerato y lo hiciste; que no me verías acabar una carrera y me viste acabar dos. Esta última etapa te la has perdido, pero siempre te he tenido presente.

¡Gracias a todos! Nos vemos en la vida...

## ÍNDICE



# Índice

<b>Gracias...</b>	<b>i</b>
-------------------	----------

<b>I- Abreviaturas</b>	<b>vii</b>
------------------------	------------

<b>II- Resumen</b>	<b>ix</b>
--------------------	-----------

<b>III- Estructura de la memoria</b>	<b>xiii</b>
--------------------------------------	-------------

<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
------------------------	----------

1.1 Los alimentos funcionales	1
-------------------------------	---

1.2 Plantas labiadas y sus propiedades biológicas	11
---	----

1.3 Romero ( <i>Rosmarinus officinalis</i> L.)	14
--	----

1.3.1 Actividades biológicas y tecnológicas de los extractos de romero	18
--	----

1.3.1.1 Actividad antioxidante	18
--------------------------------	----

1.3.1.2 Actividad antiproliferativa	24
-------------------------------------	----

1.4 Tecnologías de producción de extractos de romero con actividad antioxidante	26
---	----

1.4.1 Extracción con disolventes líquidos	26
---	----

1.4.2 Extracción con fluidos supercríticos	30
--	----

1.4.2.1. Los fluidos supercríticos	30
------------------------------------	----

1.4.2.2. Factores que afectan a la extracción supercrítica	37
--	----

1.4.3. La cromatografía supercrítica	43
--------------------------------------	----

<b>3. Plan de Trabajo</b>	<b>55</b>
---------------------------	-----------

<b>4. Equipos de tecnología supercrítica</b>	<b>61</b>
--	-----------

<b>5. Resultados y Discusión</b>	<b>69</b>
----------------------------------	-----------

5.1 Estudio de la extracción y fraccionamiento de romero mediante CO <sub>2</sub> supercrítico	69
--	----

5.1.1 Prefacio	69
----------------	----

5.1.2 Kinetic study of pilot-scale supercritical CO <sub>2</sub> extraction of rosemary ( <i>Rosmarinus officinalis</i> ) leaves	73
--	----

5.1.3 Supercritical fractionation of rosemary extracts to improve antioxidant activity	90
--	----

5.2 Extracción supercrítica de romero utilizando co-solvente (etanol) y aplicaciones de los extractos obtenidos	105
5.2.1 Prefacio	105
5.2.2 Supercritical carbon dioxide extraction of antioxidants from rosemary ( <i>Rosmarinus officinalis</i> ) leaves for use in edible vegetable oils	107
5.2.3 Supercritical rosemary extracts, their antioxidant activity and effect on hepatic tumor progression	124
5.3 Concentración de compuestos bioactivos mediante Cromatografía Supercrítica	143
5.3.1 Prefacio	143
5.3.2 Fractionation of thyme ( <i>Thymus vulgaris</i> L.) by supercritical fluid extraction and chromatography	145
5.3.3 Isolation of carnosic acid by supercritical CO <sub>2</sub> chromatography from rosemary extracts	160
<b>6. Discusión general</b>	<b>183</b>
6.1 Extracción supercrítica y aplicaciones de los extractos de romero	183
6.2. Purificación de ácido carnósico por cromatografía supercrítica	195
<b>7. Conclusiones</b>	<b>201</b>
<b>8. Bibliografía</b>	<b>205</b>
<b>9. Anexo: Otras publicaciones</b>	<b>233</b>
9.1 Kinetic study of the supercritical CO <sub>2</sub> extraction of different plants from lamiacea family	233
9.2 Isolation of essential oil from different plants and herbs by supercritical fluid extraction	233
9.3 Liquid-liquid equilibria for separation of tocopherol from olive oil using ethyl lactate	233

# I- Abreviaturas

**AcL:** Aceite de Lino.

**AcS:** Aceite de Sésamo.

**AcU:** Aceite de pepitas de uva.

**ASE:** Accelerate solvent extraction.

**AHA:** American Heart Association

**BHA:** Butilhidroxianisol.

**BHT:** Butilhidroxitolueno.

**CO<sub>2</sub>:** Dióxido de carbono.

**d<sub>c</sub>:** Diámetro de la columna.

**DHA:** Ácido docosahexanoico.

**d<sub>p</sub>:** Diámetro medio de las partículas de la fase estacionaria.

**DPPH:** Difenil-1-picrilhidrazil.

**ELS:** Extracción sólido-líquido.

**EPA:** Ácido Icosapentanoico.

**EFSA:** Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria.

**FSC:** Fluido supercrítico.

**GC:** Cromatografía de gases.

**GC-MS:** Cromatografía de gases acoplada a un detector de masas.

**GI<sub>50</sub>:** Growth Inhibition 50.

**H:** Altura equivalente a un plato teórico.

**HPLC:** Cromatografía de líquidos de alta eficacia.

**IIA:** Índice de actividad antioxidante.

**IAn:** Índice *p*-anisidina.

**IC<sub>50</sub>:** Inhibitory Concentration 50.

**IP:** Índice de Peróxidos.

**L:** Longitud de la columna.

**MTT:** Thrazolyl Blue Tetrazolium Bromide.

**N:** Número de platos teóricos.

**NCI:** Instituto Nacional del Cáncer

**NIH:** National Institute of Health.

**PLE:** Extracción con líquidos presurizados.

**PS-SFC:** Cromatografía de fluidos supercríticos semi-preparativa.

**S1:** Separador 1.

**S2:** Separador 2.

**SFC:** Cromatografía de fluidos supercríticos.

**SFE:** Extracción con fluidos supercríticos.

**TGI:** Total Growth Inhibition.

**TOTOX:** Índice de oxidación total.



## II- Resumen

Esta memoria presenta los resultados más relevantes obtenidos en el estudio titulado: "Fraccionamiento y aplicaciones de extractos supercríticos de romero (*Rosmarinus Officinalis*)".

El objetivo principal ha sido utilizar la tecnología de fluidos supercríticos para la obtención de extractos de romero con alta actividad antioxidante, su aplicación como conservante natural de alimentos y, con mucho mayor atractivo, como productos biológicamente activos en el campo de la alimentación funcional y de la biomedicina.

El interés por los alimentos funcionales está creciendo día a día debido a que, además de proporcionar las necesidades energéticas y nutricionales básicas, estos alimentos son capaces de aportar beneficios adicionales a nuestra salud. Está demostrado científicamente que una correcta alimentación y una buena actividad física son imprescindibles para llevar una vida saludable y prevenir la aparición de ciertas enfermedades, particularmente enfermedades crónicas tales como artritis, hipertensión, hipercolesterolemia, diabetes, etc. La continua información por parte de los equipos responsables de salud pública hace que la sociedad tome cada vez más conciencia de los problemas que conlleva una alimentación deficiente. Por este motivo, desde hace varios años están apareciendo en el mercado una gran cantidad de productos alimenticios catalogados como saludables, así como una gran variedad de los llamados nutraceuticos, productos que sin ser fármacos se comercializan en farmacias. Así, el empleo de extractos de romero en la producción de alimentos funcionales y nutraceuticos es particularmente atractivo, debido a que estos extractos poseen múltiples actividades biológicas, tales como antioxidante, antimicrobiana, antiviral, anticancerígena, entre otras descritas ampliamente en la bibliografía.

También, los extractos de romero pueden aplicarse dentro del campo de la conservación de alimentos. En este sentido, los antioxidantes naturales están progresivamente conquistando el mercado como sustitutos de los aditivos químicos, los que a pesar de tener una gran estabilidad y eficacia, presentan también un alto

grado de toxicidad y, según estudios recientes, efectos nocivos y promotores de algunos tipos de cáncer.

En esta memoria se describen dos técnicas utilizadas para la obtención, concentración y purificación de las sustancias antioxidantes del romero: la extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico (Supercritical Fluid Extraction, SFE), incluyendo el fraccionamiento en línea del extracto y el uso de etanol como co-solvente, y la cromatografía con CO<sub>2</sub> supercrítico semi-preparativa (Supercritical Fluid Chromatography Semi-preparative, PS-SFC). Ambas técnicas fueron elegidas por ser tecnologías medioambientalmente limpias, y por las ventajas que presentan frente a técnicas convencionales, tales como la extracción sólido-líquido utilizando disolventes orgánicos.

En primer lugar, se llevó a cabo el estudio cinético de la extracción supercrítica de hojas de romero para escalar el proceso al tamaño del equipo semi-piloto utilizado en este trabajo. Posteriormente, se realizaron diferentes pruebas incluyendo el uso de co-solvente y el fraccionamiento en línea del extracto, con el objetivo de obtener una fracción enriquecida en compuestos antioxidantes, pero atendiendo también a mantener un adecuado rendimiento de extracción.

Los diferentes extractos supercríticos de romero obtenidos, con diferente composición y actividad antioxidante, se aplicaron como conservante natural de aceites comestibles. Esta aplicación fue motivada por la reciente directiva de la Comisión Europea (Directiva 2010/67/EU de 20 de Octubre), por la que se aprueba el uso de extractos supercríticos de romero como antioxidante natural (E-392). Así, en este trabajo, se comprobó el efecto antioxidante de los extractos de romero producidos sobre tres aceites vegetales comestibles con una alta concentración de ácidos grasos insaturados, tales como aceite de lino, sésamo y pepita de uva.

Por otro lado, también se ha reportado que los extractos de romero y sus componentes aislados muestran efectos inhibitorios sobre el crecimiento de varios tipos de cáncer, tales como mama, colon, próstata y pulmón, reprimiendo la iniciación y promoción de la tumorigenesis de melanoma y glioma en modelos animales. En este trabajo se ha estudiado el efecto antiproliferativo sobre células cancerígenas hepáticas de los extractos supercríticos de romero producido.

En cuanto a la cromatografía de fluidos supercríticos, cabe destacar que, si bien son muchas las aplicaciones conocidas en el campo de la farmacia y en el fraccionamiento de lípidos, son escasos los estudios publicados vinculados al fraccionamiento de fitoquímicos presentes en extractos de matrices vegetales. En este trabajo, se ha llevado a cabo el fraccionamiento de extractos supercríticos de romero utilizando diferentes columnas y condiciones de operación, con el objetivo de obtener una fracción altamente concentrada en ácido carnósico, sustancia reconocida como el antioxidante mayoritario del romero.

En resumen, los trabajos realizados y presentados en esta memoria contribuyen al desarrollo de extractos naturales derivados del romero, obtenidos por medio de tecnologías limpias e innovadoras, lo que promete la producción sostenible y a gran escala de productos que pueden ser aplicados en el campo de la conservación de alimentos y de la alimentación funcional, apoyando el desarrollo de la investigación en biomedicina.



### III- Estructura de la memoria

La presente memoria se encuentra estructurada en siete secciones, detalladas a continuación:

**Introducción:** presentación de los fundamentos y antecedentes correspondientes a los trabajos realizados.

**Justificación y Objetivos:** planteamiento de las hipótesis del plan de trabajo, así como los objetivos generales y parciales de esta memoria.

**Plan de trabajo:** descripción de la metodología y los procedimientos aplicados, los materiales utilizados, y las tareas realizadas para alcanzar los objetivos planteados.

**Descripción de las plantas de FSCs:** explicación detallada de los equipos utilizados de tecnología supercrítica.

**Resultados y Discusión:** exposición de los resultados obtenidos divididos en tres sub-secciones encabezadas cada una por un prefacio, donde se explica de forma general y resumida el contenido de cada sección. En estos prefacios se justifican y enlazan las publicaciones derivadas de esta memoria, las que se incluyen a continuación, presentadas en inglés y con el esquema convencional de las publicaciones científicas (resumen, introducción, materiales y métodos, resultados, discusión, agradecimientos y bibliografía).

**Discusión general:** se presenta una discusión general de los trabajos presentados en la memoria, relacionando los resultados obtenidos en las distintas sub-secciones.

**Conclusiones:** presentación de las conclusiones generales y más relevantes obtenidas en los trabajos expuestos y discutidos en las secciones anteriores.



# INTRODUCCIÓN





# 1. Introducción

## 1.1 Los alimentos funcionales

“Que tu alimento sea tu medicina, y que tu medicina sea tu alimento” dijo Hipócrates (460 A.C) avanzando así una de las mayores preocupaciones de finales del siglo XX y principios del siglo XXI en cuanto a salud se refiere: el binomio alimentación y salud. En Europa, ha aumentado considerablemente el interés de los consumidores por conocer esta relación y actualmente la sociedad reconoce en mayor medida que llevar un estilo de vida sano, incluida la dieta, puede contribuir a reducir el riesgo de padecer enfermedades y dolencias y a mantener el estado de salud y bienestar. Es en este contexto en el que aparecen los llamados alimentos funcionales, pero ¿qué son los alimentos funcionales y cómo surgieron?

A pesar de que la idea de un alimento funcional es muy antigua, el concepto nace en Japón en los años 80, cuando las autoridades vieron que para controlar los gastos globales en salud era necesario desarrollar alimentos que mejoraran la calidad de vida de la población, cubriendo ciertas deficiencias pandémicas. En 1984 científicos japoneses estudiaron la relación entre nutrición y modulación de sistemas psicológicos, y es en 1991 cuando por primera vez en Japón se comienza a emplear el término FOSHU (acrónimo en inglés de Food Of Specific Health Use), refiriéndose a alimentos procesados que contenían ingredientes que podrían tener un efecto fisiológico beneficioso (Burdock y col., 2006). La demanda de este tipo de alimentos ha crecido en este país asiático y se ha extendido por Europa y EE.UU de una manera significativa desde finales del siglo XX.

Aunque ha habido un enorme crecimiento y el término “alimento funcional” se ha ido haciendo cada vez más popular debido a que representa un enlace entre la nutrición, la dieta y la salud, en la actualidad no existe unanimidad en su definición. El concepto más aceptado es el del documento de consenso *Functional Food Science in Europe* (FUFOSE) elaborado por el *Internacional Life Science Institute* (ILSI): “un alimento puede considerarse funcional cuando se demuestra adecuadamente que, además de sus efectos nutritivos, afecta beneficiosamente a una o más funciones del

organismo de forma que mejora su estado de salud o bienestar o reduce el riesgo de enfermedad” (Ashwell y col., 2004).

Debido a la creciente demanda por parte de los consumidores de este tipo de alimentos, surgió la necesidad de establecer criterios que regulasen el desarrollo y la publicidad de los mismos, protegiendo así a los consumidores de las atribuciones de propiedades falsas o confusas, las cuales podrían suponer un engaño y fraude. Esta protección se ha intentado conseguir con el reglamento (CE) No 1924/2006 del Parlamento Europeo y con sus modificaciones posteriores cuya finalidad ha sido garantizar un elevado nivel de protección al consumidor, introduciendo la evaluación científica como requisito previo para poder realizar una declaración nutricional o de propiedad saludable, así como la comprensión de esa información por parte de los consumidores y la armonización de las normativas de todos los estados miembros en el ámbito de los alimentos funcionales.

Este reglamento define el término “declaración” como cualquier mensaje o representación que no sea obligatorio con arreglo a la legislación comunitaria o nacional, incluida cualquier forma de representación pictórica, gráfica o simbólica, que afirme, sugiera o de a entender que un alimento posee unas características específicas. El reglamento distingue tres tipos de declaraciones:

*-Declaración nutricional:* Será aquella que afirme, sugiera o de a entender que un alimento posee propiedades nutricionales benéficas específicas con motivo del aporte energético o por el aporte de sus nutrientes.

*-Declaración de propiedades saludables:* Será aquella que afirme, sugiera o de a entender que existe relación entre una categoría de alimentos, un alimento o uno de sus constituyentes y la salud.

*-Declaración de reducción del riesgo de enfermedad:* será aquella que afirme, sugiera o de a entender que el consumo de una categoría de alimentos, un alimento o uno de sus constituyentes reduce significativamente un factor de riesgo de aparición de una enfermedad humana.

Con estas declaraciones en mente, los alimentos funcionales representan un mercado muy atractivo para la industria alimentaria (Siro y col., 2008) y, consecuentemente, un campo muy importante dentro de la investigación en

alimentos. En Europa, las ventas de alimentos funcionales han aumentado significativamente, siendo Alemania, Francia, Reino Unido y los Países Bajos los países más importantes en el mercado de alimentos funcionales (Jago. 2009). Otros países Europeos también están emergiendo, como es el caso de España, Hungría o Polonia. España actualmente ofrece más de 200 alimentos funcionales en el mercado.

Indiscutiblemente, los probióticos dominan el mercado de los alimentos funcionales, con 379 productos lanzados al mercado en todo el mundo en 2005 (Ouwehand, 2007). Los ingredientes probióticos son microorganismos vivos (bifidobacterias, lactobacilos) que contribuyen a mejorar la flora intestinal. La mayoría se añaden a alimentos lácteos, representando un 56 % del total de los alimentos funcionales (Benkouider y col., 2005) y el principal mercado de estos productos son los países escandinavos, los Países Bajos, Suiza, Croacia y Estonia, mientras que Grecia, Francia y España son considerados mercados en desarrollo (Makinene-Aakula, 2006). Algunos ejemplos comerciales de alimentos funcionales probióticos son actimel, activia, ProViva, Vifit, Vitality entre otros. Por otro lado, entre los prebióticos más conocidos (ingredientes no digeribles que estimulan el crecimiento y/o actividad de las bacterias del colon) encontramos fructo-oligosacáridos (FOS), inulina, isomalto-oligosacáridos (OMI), polidextrosa, lactulosa y almidón. Los prebióticos pueden mejorar el crecimiento y la supervivencia de los cultivos probióticos y debido a esta sinergia a los alimentos que contienen una combinación de ambos ingredientes se les denomina simbióticos (Gibson y col., 1995).

Entre el resto de los ingredientes funcionales ocupan un papel relevante la gran cantidad de sustancias que metabolizan los vegetales (fitoquímicos) y que poseen importantes y reconocidas actividades biológicas. Desde la antigüedad se han atribuido a numerosas plantas, hierbas y otros productos vegetales propiedades curativas (antiséptica, antibiótica, expectorante, antimicrobiana, antiinflamatoria) y se han utilizado en la medicina tradicional desde tiempos ancestrales (Fornari y col., 2012). Actualmente, estas sustancias están disponibles en el mercado como infusiones, comprimidos y/o extractos. Más recientemente, se ha reconocido que una de las principales propiedades biológicas de varios de estos vegetales (por ejemplo

romero, salvia, tomillo, clavo) es su actividad antioxidante, siendo registrados como fuentes de antioxidantes naturales.

Los numerosos estudios que aportan actualmente evidencia científica de las actividades biológicas beneficiosas de estos productos vegetales, así como los estudios que los vinculan con su capacidad para reducir el riesgo a padecer enfermedades crónicas, hacen que los extractos naturales puedan ser utilizados como ingredientes funcionales para el desarrollo de alimentos con declaraciones de propiedad saludable y/o de reducción del riesgo de enfermedad. Así, las fuentes naturales de sustancias bioactivas y los nuevos enfoques industriales para extraer y aislar estas sustancias, están ganando mucha atención en la alimentación y en el campo de la investigación farmacéutica. En ésta última son numerosos los ejemplos de principios activos que se descubrieron de la naturaleza y se utilizaron para desarrollar la fabricación del medicamento sintético. El ejemplo más claro y popular es la aspirina (ácido acetilsalicílico), originalmente derivado de la corteza del sauce blanco.

Los principales constituyentes fitoquímicos de interés de origen vegetal que encontramos se pueden agrupar en compuestos fenólicos, terpenos y derivados, lípidos y compuestos azufrados.

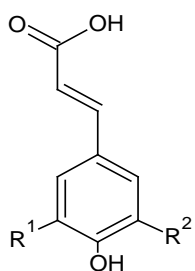
Los compuestos fenólicos constituyen uno de los grupos más numerosos y ampliamente distribuidos del reino vegetal, con una lista de más de 8000 estructuras que sigue en continuo crecimiento. Existen numerosas clasificaciones, pero normalmente se agrupan según el número de anillos fenólicos que contienen y en función de cómo se unen entre sí. Se distinguen dos grandes grupos de moléculas, flavonoides y no flavonoides (Figura 1.1), siendo el primero el más numeroso. Sus estructuras abarcan desde moléculas muy simples, como los ácidos fenólicos, hasta otras altamente polimerizadas, como los taninos. Suelen encontrarse en la naturaleza unidos a azúcares, principalmente la glucosa.

Los compuestos fenólicos presentes en las plantas pueden tener varias funciones. Pueden actuar como antioxidantes, inhibir o activar el crecimiento de las plantas, inhibir la degradación de la auxina (hormona vegetal), captar el 90 % de las radiaciones UV impidiendo los efectos nocivos de las radiaciones en los tejidos internos, formar parte de la composición de esencias y pigmentos, etc. También los

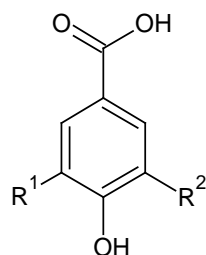
fenoles protegen a las plantas generando sabores (principalmente amargos) o texturas (los taninos) que resultan desagradables para los herbívoros. Estos compuestos se encuentran prácticamente en todas las plantas y por tanto se encuentran integrados en la dieta humana (Cheynier, 2005).

Una vez incorporados a la dieta humana, los compuestos fenólicos pueden tener variados efectos. Como antioxidantes, se les ha atribuido una gran cantidad de propiedades beneficiosas para la salud, ya que pueden proteger estructuras celulares del ataque de especies reactivas del oxígeno y así limitar el riesgo de padecer enfermedades asociadas al estrés oxidativo. Existen numerosos estudios que atribuyen a los polifenoles de la dieta un importante papel en la prevención de enfermedades cardiovasculares, cáncer, osteoporosis, diabetes mellitus y enfermedades neurodegenerativas (Scalbert y col., 2005). Sin embargo, en los últimos años se han publicado nuevos estudios que sugieren una gran variedad de mecanismos de acción diferentes a la acción antioxidante, a través de los cuales los compuestos fenólicos podrían ejercer parte de sus acciones beneficiosas sobre los sistemas biológicos. Entre estos mecanismos destacan su capacidad para modular la actividad de enzimas tales como la telomerasa (Naasani y col., 2003), la ciclooxigenasa (Hussain y col., 2005), la lipooxigenasa (Sadik y col., 2003), o su capacidad para interactuar con señales de transducción y receptores celulares (Kris-Ethernon y col., 2002). También se han descrito sus efectos en el tratamiento de la infección por VIH (Artico y col., 1998) y se han puesto de manifiesto sus efectos antiinflamatorios (Biesalski, 2007), antidiabéticos (Manach y col., 2005) y antiobesidad (Hsu y col., 2008). Algunos de los compuestos fenólicos más conocidos en alimentación son la quercetina, el resveratrol, las isoflavonas y las procianidinas, los cuales pueden encontrarse en el vino, la soja, la uva, el brócoli, el té, la manzana, etc.

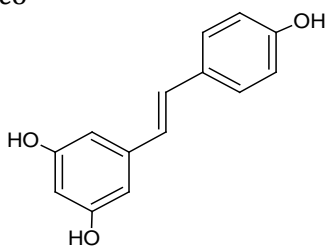
## No Flavonoides



**Ácidos hidroxicinámicos**  
Ej: Ácido Caféico

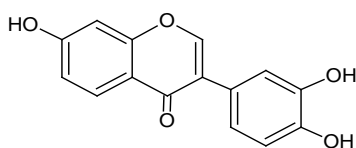


**Ácidos benzóicos**  
Ej: Ácido Gálico

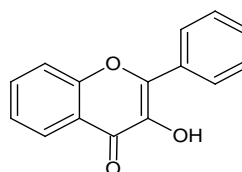


**Estilbenos**  
Ej: Resveratrol

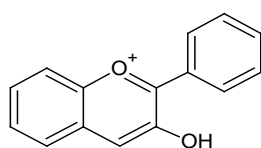
## Flavonoides



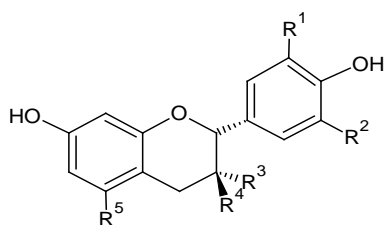
**Isoflavona**  
Ej: Genisteína



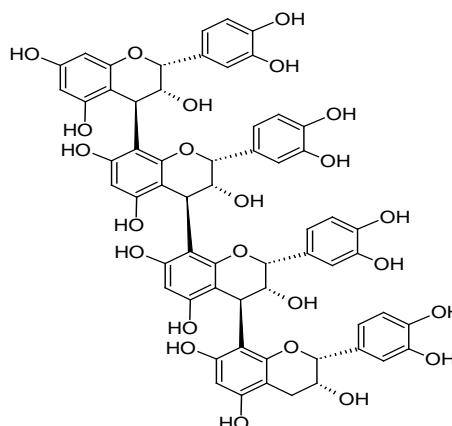
**Flavonoles**  
Ej: Quercitina



**Antocianidina**



**Flavanoles**  
Ej: Catequina



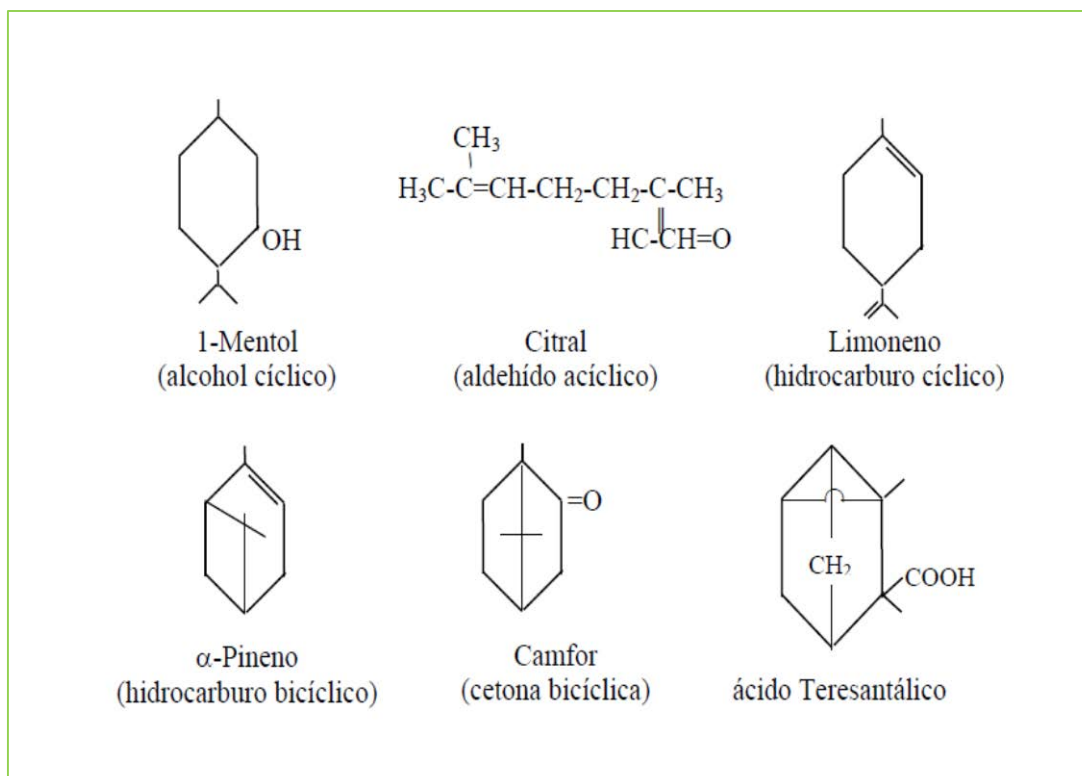
**Proantocianidinas**

**Figura 1.1.** Clasificación de los principales compuestos fenólicos.

Los terpenos son compuestos con una estructura química derivada del isopreno (2-metil-1,3-butadieno) y se clasifican en monoterpenos (C<sub>10</sub>), sesquiterpenos (C<sub>15</sub>), diterpenos (C<sub>20</sub>), triterpenos (C<sub>30</sub>), tetraterpenos (C<sub>40</sub>), etc. Cuando los terpenos son modificados químicamente, por ejemplo por oxidación o reorganización del esqueleto hidrocarbonado, se denominan terpenoides. Los terpenos y terpenoides más intensamente estudiados por sus propiedades biológicas son los monoterpenos, los carotenoides (tetraterpenos) y los fitoesteroides.

Los monoterpenos son los componentes más importantes de las esencias volátiles de las flores y de los aceites esenciales de hierbas y especias y forma parte de hasta el 10 % en peso de la planta seca. También se encuentran en la cáscara de frutas cítricas (limonoides). Pueden presentar estructuras acíclicas, mono-, bi- o tricíclicas, tal como los ejemplos que se muestran en la Figura 1.2. La presencia de dobles enlaces en su estructura química hace que sean sustancias inestables, expuestas a isomerización y reordenamientos moleculares, con rangos estrechos de ebullición y difíciles de separar. Están presentes en las raíces y rizomas de las plantas (por ejemplo, el jengibre), en sus hojas (menta, laurel, orégano, eucaliptus), en la corteza, ramas, madera (canela, alcanfor), en los pétalos de las flores (jazmín, rosa, violeta, lavanda) así como en los frutos y semillas (naranja, limón, pimienta, nuez moscada).

La temperatura normal de ebullición de los compuestos terpénicos hidrocarbonados oscila entre 150°C y 185°C, mientras que la temperatura normal de ebullición de los derivados oxigenados es 200°C - 230°C. En general, los procesos de extracción y fraccionamiento de las esencias se efectúan a  $T < 180^{\circ}\text{C}$  para evitar su descomposición térmica.



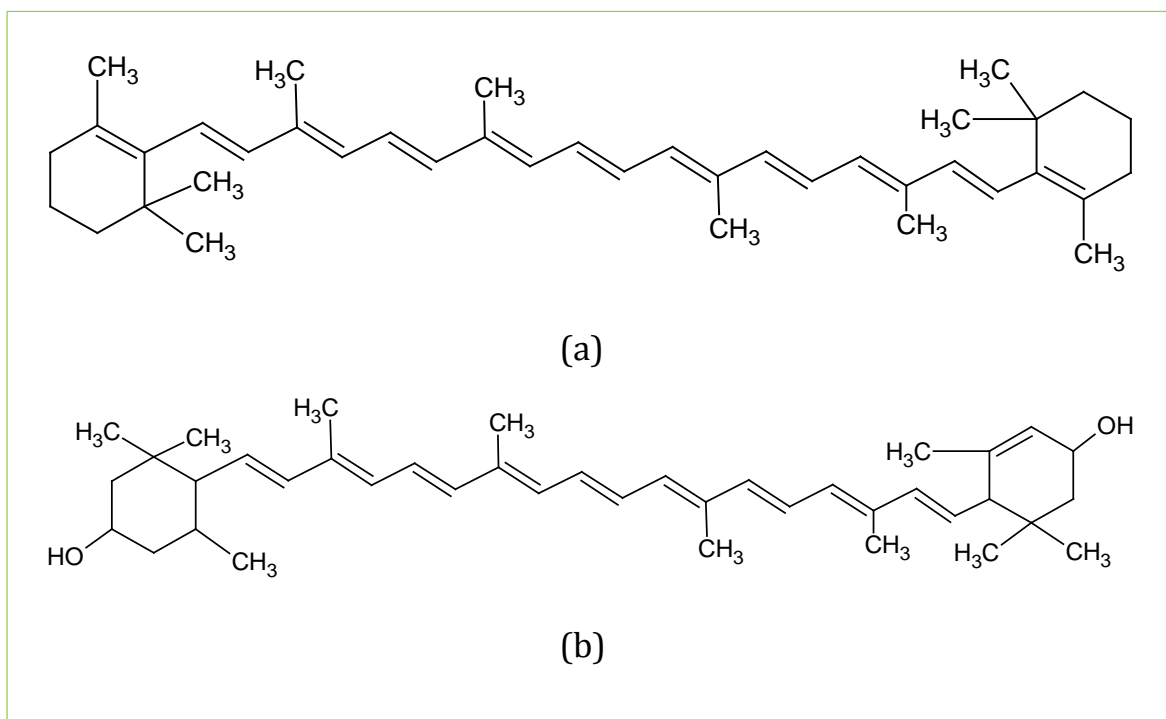
**Figura 1.2.** Ejemplos de monoterpenos presentes en el aceite esencial.

Los carotenoides son tetraterpenos, pigmentos ampliamente distribuidos en el reino vegetal. La concentración de estos pigmentos en los tejidos vegetales depende de las condiciones agronómicas, especialmente de la exposición a la luz y el aporte de nitrógeno. Son pigmentos de color amarillo intenso, naranja y rojo que se encuentran en vegetales como el tomate, el perejil, la naranja, la espinaca, etc. La familia de los carotenoides, de los cuales existen más de 600 compuestos, incluyen dos tipos distintos de moléculas: carotenos y xantofilas. Los carotenos son hidrocarburos, mientras que las xantofilas poseen átomos de oxígeno en su estructura química (Figura 1.3).

La importancia principal de los carotenoides, así como de los alimentos que los contienen, se basa en sus dos propiedades más importantes, la actividad provitáminica A de alguno de ellos ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ -carotenos) y su capacidad antioxidante (Grassmann y col., 2002). Además, son capaces de modular la patogénesis de los cánceres (Slattery y col., 2000) y de enfermedades coronarias (Kritchevsky y col., 1999). La Figura 1.3 muestra la estructura química del  $\beta$ -caroteno, el caroteno más activo como provitamina A, y de la luteína, la que se utiliza como aditivo antioxidante

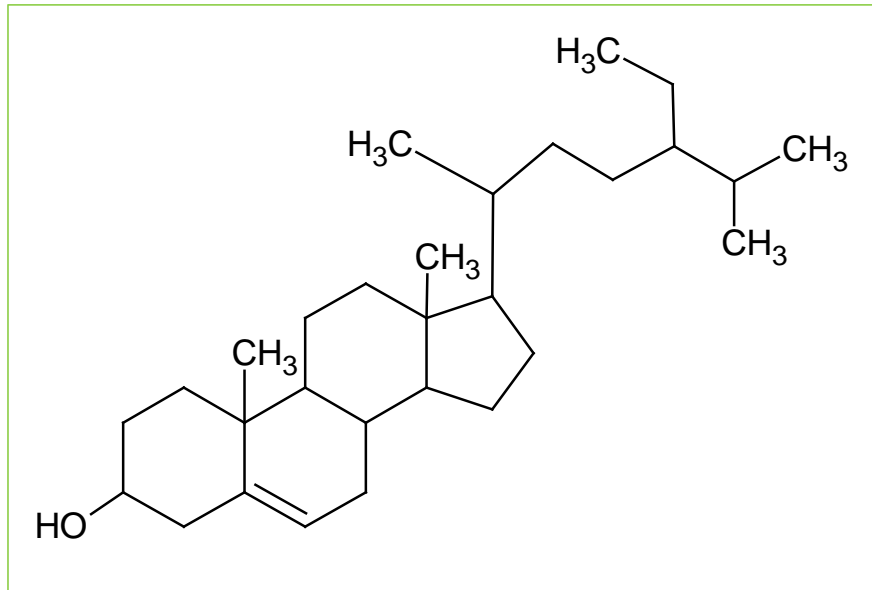


en el tratamiento comercial de los alimentos y se reconoce por su efecto positivo en la reducción de la degeneración de la mácula ocular.



**Figura 1.3.** Estructura química de (a)  $\beta$ -caroteno y (b) luteína.

Los fitoesteroles (Figura 1.4) son compuestos con una estructura química similar a la del colesterol y se pueden encontrar de forma natural en varias plantas y productos derivados, incluyendo los aceites. Los fitoesteroles inhiben la absorción del colesterol y se eliminan en el ser humano por las heces. Una dieta normal puede ofrecer entre 150 y 450 mg/día.



**Figura 1.4.** Estructura química de un fitoesterol: sitosterol.

Existe evidencia científica desde el año 1950 de que los fitoesteroles inhiben el colesterol (Cheynier, 2005), pero no es hasta la década de los 90 cuando aumenta el interés por estas moléculas ya que se descubre que pueden esterificarse con ácidos grasos y así incorporarse a los alimentos, tales como margarinas, mayonesa y productos bajos en grasa, en particular productos lácteos (yogur, leche). Actualmente el uso de alimentos con fitoesteroles es recomendado por la American Heart Association (AHA) en pacientes con hipercolesterolemia.

## 1.2 Plantas labiadas y sus propiedades biológicas

Las lamiáceas (Lamiaceae), también llamadas labiadas, son una familia de plantas aromáticas que comprende unos 210 géneros y alrededor de 3.500 especies, perteneciente al orden Lamiales. Está constituida principalmente por hierbas o arbustos que tienen en todas sus partes glándulas secretoras de aceites esenciales volátiles.

En la Región mediterránea viven unas 1000 especies de plantas Labiadas correspondientes a 48 géneros, distribuidos principalmente en la zona asiática y mediterránea. Los géneros más importantes en cuanto a número de especies son *Teucrium* (141), *Stachys* (133), *Salvia* (131), *Thymus* (114) y *Sideritis* (87).

Una gran cantidad de estas plantas ha sido tradicionalmente empleada en medicina desde la antigüedad actuando como desinfectante, digestiva, diurética, expectorante, etc. y en la actualidad siguen siendo utilizadas en forma de infusiones, comprimidos o extractos. Los aceites esenciales obtenidos de estas plantas han sido tradicionalmente utilizados en la fabricación de diferentes productos alimentarios, cosméticos, productos de limpieza, perfumes, herbicidas o insecticidas. Estos aceites esenciales representan una pequeña fracción de la composición total de la planta, y sus compuestos principales: terpenos, sesquiterpenos y derivados oxigenados (alcoholes, aldehídos, cetonas, ácidos, fenoles, éteres, ésteres, etc.), son los responsables del olor y sabor característico de la planta (Pourmortazavi y col., 2007).

Debido a que estas plantas son fuentes naturales de sustancias con diferentes propiedades biológicas, están siendo objeto de importante atención en el campo de la investigación alimentaria y farmacéutica; promoviendo el desarrollo de nuevos enfoques de procesos industriales para extraer y aislar estas sustancias a partir de las plantas.

Dentro de las plantas labiadas algunas de ellas han sido particularmente estudiadas. El orégano (*Origanum vulgare*) es utilizada como planta medicinal principalmente por su poder anti-bacteriano y antifúngico (Elgayyar y col., 2001; Sokovic y col., 2002). Estas actividades se atribuyen a su aceite esencial, el cual contiene principalmente los isómeros timol y carvacrol (Kokkini y col., 1997). Otras

propiedades biológicas estudiadas en el orégano son su actividad antioxidante y antimutagénica (Ozbek y col., 2008).

El tomillo es el nombre común con el que se conocen a diversas plantas del género *Thymus* de la familia de las labiadas. Entre las especies más conocidas en nuestro país, y que gozan de una mayor propagación y aprovechamiento, se encuentran *T. zygis*, *T. hyemalis*, *T. vulgaris*, *T. piperella*, *T. rumidicus hispánicos*, *T. communis*, etc. De esta planta, y en concreto de su aceite esencial, se ha demostrado sus propiedades como antiséptico, antiespasmódico, antimicrobiano, antifúngico y antiviral (Soliman y Badeaa., 2002; Bukovska y col. 2007). En concreto, el timol y el carvacrol, compuestos mayoritarios de los aceites esenciales en la mayoría de las especies de tomillo, tienen alta actividad como antiinflamatorios (Braga y col., 2006), inmunomoduladores (Suzuki y Furuta., 1988), antioxidantes (Tian y Lai., 2006; Mastelic y col., 2008; Aeschbach y col., 1994), antibacterianos (Didry y col., 1994) y antifúngicos (Segvi Klari y col., 2007).

La salvia (*Salvia officinalis* L.) se encuentra dentro de las plantas labiadas con la denominación “*officinalis*”, que en latín significa medicinal. EL género *Salvia* comprende alrededor de 900 especies y está extendida a lo largo de todo el mundo. Es una hierba de cocina popular y además ha sido utilizada en una variedad de preparaciones de alimentos desde la antigüedad, tiene una reputación histórica para la promoción de la salud y el tratamiento de enfermedades (Kintzios y col., 2000). Los extractos de *Salvia Officinalis* L., poseen una amplia gama de propiedades por lo que pueden ser utilizados en múltiples aplicaciones. Entre ellas se le reconoce por su acción antioxidante (Ivanovic y col., 2009), antibacteriana (Hayouni y col., 2008), anti-inflamatorio y antifúngico (Weckesser y col., 2007) y por poseer propiedades antidiabéticas (Menaker y col., 2004).

La albahaca (*Ocimum Basilicum* L.) tiene su origen en climas cálidos tropicales de la India, África y el sur de Asia (Eileen y col., 2011). Es principalmente conocida a nivel popular por su uso en cocina, pero también es reconocida por su valor en la medicina tradicional (Chanwithessuk y col., 2005). La albahaca es un estimulante digestivo con propiedades antimicrobianas (Suppakul y col., 2003), antibacterianas (Carovic y col., 2010), anticonvulsivas (Freire y col., 2006) y anticancerígenas (Holm y

col., 1999). Su alto contenido en ácidos fenólicos contribuye a su capacidad antioxidante (Lee y col., 2010).

La mejorana (*Origanum majorana*) es una planta herbácea nativa del sur de Europa y del área Mediterránea. Debido a la variabilidad en la composición química y fragancia, es muy utilizada para aromatizar diferentes productos alimenticios y bebidas (Sari y col., 2006). Contiene terpenoides fenólicos (timol y carvacrol), flavonoides (diosmetina, luteolina, y apigenina), taninos, hidroquinona, glucósidos fenólicos (arbutina, metil-arbutina, vitexina, orientina,) y triterpenoides (ácido ursólico y ácido oleanólico) (El-Ashmawy y col., 2005). Esta composición le confiere diferentes propiedades tales como capacidad antioxidante (Ghada y col., 2011), antimicrobiana (Sari y col., 2006), antiproliferativa y apoptóticas (Roula y col., 2010).

Además de las variedades mencionadas y descritas, existe una extensa lista de plantas labiadas (laurel, lavanda, menta, etc.) que está siendo intensamente estudiadas por sus propiedades biológicas saludables. Particularmente, el romero es la planta labiada objeto del estudio presentado en esta memoria y, por lo tanto, se describe detalladamente en la sección siguiente.

### 1.3 Romero (*Rosmarinus officinalis* L.)

El romero (*Rosmarinus officinalis* L.) (Figura 1.5) es una planta medicinal que pertenece al orden *Lamiales*, familia *Lamiaceae*, género *Rosmarinus* L.

Es un arbusto de tallos leñosos que alcanza de 0,5 a 1 m de altura, aunque puede llegar a dos metros. Las hojas tienen forma lineal, con una longitud de 2 a 3 centímetros y unos 3 milímetros de anchura. Posee fuerte olor aromático. Se cultiva en laderas y collados de tierra baja, sobre todo en los terrenos calcáreos, desde la costa hasta los 1500 metros de altitud. En España, se puede encontrar en la mayor parte de Cataluña, hasta los Pirineos, en Aragón y Navarra, Castilla la Mancha, Valencia, Murcia, Andalucía, Extremadura y las Islas Baleares.



**Figura 1.5.** Romero (*Rosmarinus officinalis* L.).

La composición de las distintas partes de la planta puede variar de forma notable según el origen, el quimiotipo de que se trate y su etapa de desarrollo en el momento de la recolección. Una gran número de compuestos, que pueden representar hasta el 2.5 % de la composición de la hoja, forman parte de lo que se denomina el aceite esencial de la planta, un líquido incoloro o con un ligero tinte amarillo y verdoso, de olor alcanforado, responsable principal del aroma característico del romero. Los compuestos mayoritarios del aceite esencial son terpenos, como el  $\alpha$ -pineno y el limoneno, y terpenoides como 1,8 cineol, linalool, alcanfor, borneol, terpineol, verbenona,  $\alpha$ -cariofileno y ferruginol. Otro gran grupo de compuestos que forman parte importante de la planta son los compuestos fenólicos,

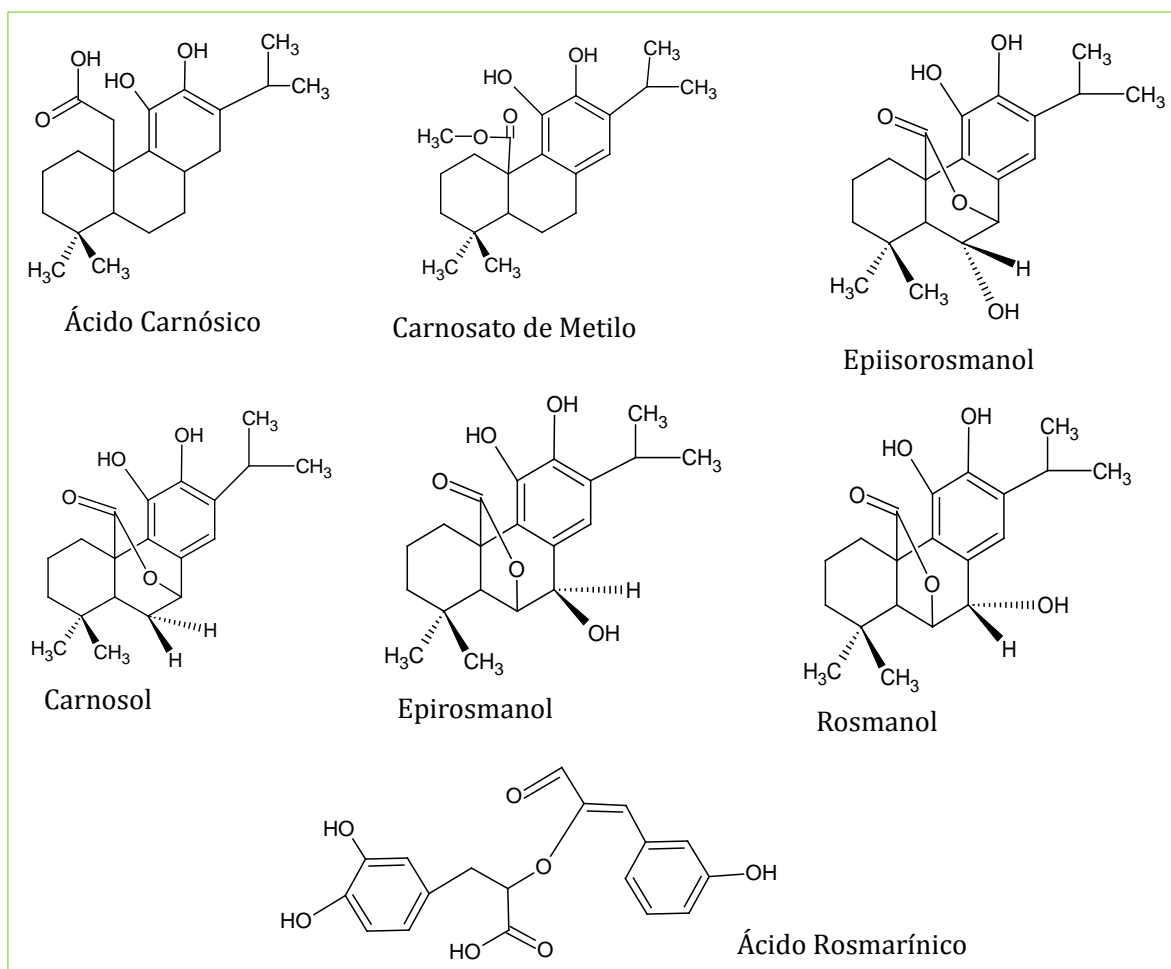
tales como el ácido carnósico, ácido rosmarínico y derivados de los anteriores como carnosol, rosmanol, rosmadial, carnosato de metilo (Schwarz y col., 1992a; Schwarz y col., 1992b).

Desde la antigüedad se ha atribuido a esta planta innumerables propiedades medicinales, hoy verificadas científicamente, tales como actividad antiséptica o antibacteriana (Catalina y col., 2009), diurética (Haloui y col., 2000), anticancerígena (Offord y col., 1995) y, muy especialmente, actividad antioxidante (Naciye y col., 2008). Así, esta planta ha sido tomada como referencia por la comunidad científica para llevar a cabo importantes estudios en el campo de la biomedicina, buscando resultados beneficiosos para la salud humana.

Las propiedades antioxidantes de las especias se conocen desde comienzos de los años 50 (Chipault y col., 1952). En 1955 se descubrió que el romero era una de las especias que poseían en mayor medida esta actividad (Rac y col., 1955). Por ello, diferentes tipos de extractos de romero obtenidos por muy diversas técnicas se utilizan ampliamente en el ámbito de la alimentación (conservación de productos cárnicos, pescados, repostería), la farmacia y la cosmética, y cada vez más, se abre camino en el campo de la medicina relacionándolo fundamentalmente con la prevención de enfermedades producidas por el estrés oxidativo (Robards y col., 1997; Voutilainen y col., 2006).

El componente principal responsable de la actividad antioxidante es un diterpeno fenólico, el ácido carnósico, cuya estructura fue confirmada por Wu y col., en 1982. Estos mismos autores confirmaron también la presencia de otro compuesto fenólico, el carnosol, aislado en 1966 por Brieskorn y col., y al que se le atribuyó en primer lugar las propiedades antioxidantes de la planta (Aruoma y col., 1992; Coulivier y col., 1996). Algunos autores señalan al carnosol como el componente mayoritario de los extractos de romero, pero en realidad procede, junto con otros compuestos fenólicos presentes en el romero, de la oxidación del ácido carnósico que se dan durante las operaciones de extracción (Schwarz y col., 1992a). Numerosos compuestos que tienen también importancia en la actividad biológica del romero fueron identificados con posterioridad como el rosmanol, ácido rosmarínico (Inatani y col., 1982), rosmadial (Inatani y col., 1983), el epirosmanol e isorosmanol (Nakatani y col., 1984), rosmaridifenol y rosmariquinona (Houlihan y col., 1985).

Particularmente, el ácido rosmarínico, un derivado del ácido cafeico y el ácido ursólico, es un triterpenoide pentacíclico con reconocidas propiedades anticancerígena y antiinflamatoria (Costa y col., 2007; Anderson y col., 2008). Las estructuras químicas de todos estos compuestos se muestran en la Figura 1.6.



**Figura 1.6.** Principales compuestos responsables de la actividad antioxidante del romero.

Gracias a su contenido en compuestos antioxidantes, los extractos de romero son capaces de sustituir a antioxidantes sintéticos como el butilhidroxianisol (BHA) y el butilhidroxitolueno (BHT), utilizados en la industria de alimentos como conservantes (Babovic y col., 2010) o en cosmética (Etter, 2005), paliando de esta manera los efectos nocivos que los antioxidantes sintéticos pueden producir. Por otro lado, son numerosos los estudios que tratan sobre la capacidad antioxidante de



los extractos de romero y su vinculación directa con la salud (Bubonja-Sonje y col., 2011; Zegura y col., 2011; Visentin y col., 2012).

## **1.3.1 Actividades biológicas y tecnológicas de los extractos de romero**

### **1.3.1.1 Actividad antioxidante**

Los procesos de oxidación son unos mecanismos que alteran la composición y propiedades sensoriales de los alimentos, deterioran su calidad y disminuyen su valor nutricional debido entre otras razones a la destrucción de vitaminas liposolubles. En el caso concreto de aceites y grasas comestibles, o matrices alimentarias con un alto contenido graso, la oxidación lipídica es la causa más importante de su deterioro y degradación y se caracteriza principalmente por la aparición de olores y sabores indeseables.

El inicio de la oxidación lipídica y su propagación radical da lugar a compuestos de oxidación primaria, los hidroperóxidos por ejemplo, que rápidamente se degradan, originando los compuestos de oxidación secundaria, como compuestos volátiles (alcoholes, aldehídos, ácidos, hidrocarburos o cetonas). Estos últimos, son más estables que los hidroperóxidos y tienen una gran repercusión desde el punto de vista sensorial al ser responsables del aroma propio de las grasas, así como del aroma alterado o la rancidez.

La oxidación lipídica no actúa de la misma manera en todos los aceites y grasas ya que depende de su composición y la susceptibilidad que cada uno presenta. Aquellos aceites que contengan en su composición mayor cantidad de insaturaciones o ácidos grasos poliinsaturados serán más fácilmente oxidables que aquellos que contengan principalmente monoinsaturados o saturados. Por ejemplo, aceites de pescado, lino o soja serán más susceptibles a la oxidación que un aceite de oliva, colza o almendras. Por otro lado, aquellos que presenten mayor contenido en ácidos grasos saturados, como por ejemplo el aceite coco o palma, serán los que menos sufrirán estas alteraciones.

La determinación de los compuestos resultantes de la oxidación lipídica es de gran importancia en la industria alimentaria puesto que permite evaluar la calidad y seguridad del aceite. Existe una gran diversidad de métodos que permiten medir los cambios producidos por la oxidación lipídica en la industria de los aceites. Con

frecuencia se utiliza el índice de peróxidos (IP), como indicador de la oxidación primaria y el índice *p*-anisidina (IAn), como indicador de la oxidación secundaria. La combinación de ambos índices permite el cálculo del índice de oxidación total (TOTOX). Otro método ampliamente utilizado es el método rancimat, el cual permite estudiar la estabilidad oxidativa de los aceites y grasas.

Debido a las múltiples ventajas que presentan para la salud el consumo de ácidos grasos poliinsaturados (ácido linoleico ( $\omega$ -6), ácido alfa linoleico ( $\omega$ -3) y monoinsaturados (ácido oleico), (Bocca y col., 2010; Navarro y col., 2006) es necesario garantizar en los aceites y aquellos alimentos que contengan grasas la estabilidad de estos ácidos grasos. El aumento de la estabilidad de un aceite es posible gracias a la adición de sustancias capaces de retardar la oxidación lipídica. Normalmente se emplean antioxidantes sintéticos, sin embargo, es un hecho que preocupa cada vez más a los consumidores, puesto que algunos de ellos han sido reconocidos con efectos nocivos para la salud. Gracias al contenido en los compuestos antioxidantes, los extractos de romero son capaces de sustituir a antioxidantes sintéticos como el butilhidroxianisol (BHA) y el butilhidroxitolueno (BHT), utilizados en la industria de alimentos (Babovic y col., 2010) o en cosmética (Etter, 2005), evitando de esta manera los efectos perjudiciales que los antioxidantes sintéticos pueden producir. Existen varios trabajos sobre la actividad antioxidante de extracto de romero obtenido por métodos convencionales (hidro destilación o extracción con disolventes líquidos) en diferentes productos cárnicos (Riznar y col., 2006; Georgantelis y col., 2007) y diversos aceites vegetales; tales como el aceite de girasol (Rizner-Hras y col., 2000), cacahuete (Ozcan, 2003.) o soja (Ramalho y col., 2008). Sin embargo, los estudios centrados específicamente en el uso de extractos supercríticos de romero como antioxidante añadido a alimentos son escasos. Por ejemplo, Bavovic y col (2010) estudiaron la actividad antioxidante de extractos supercríticos de romero, salvia y tomillo en la prevención de la oxidación de aceite de girasol. Los mejores resultados se obtuvieron con los extractos de salvia y romero. Otros autores han mostrado un efecto antioxidante sobre el aceite de germen de trigo (Yesil-Celiktas, 2009) y recientemente, Martín y col., (2012), probaron el empleo de una mezcla de extracto supercrítico de romero y  $\alpha$ -tocoferol en la protección de los concentrados de  $\omega$ -3 de aceite de pescado, obteniendo resultados muy positivos.

Recientemente la comisión europea publicó la Directiva 2010/67/EU de 20 de Octubre de 2010, modificando la Directiva 2008/84/CE, por la que se establecen criterios específicos de pureza de los aditivos alimentarios distintos de colorantes y edulcorantes. En esta última directiva, se afirma que la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) ha evaluado la información sobre la seguridad de diferentes aditivos de origen natural.

En concreto, la utilización del extracto de romero como aditivo E-392 está permitida y regulada por la reciente directiva. La ley afirma que los extractos de romero contienen varios componentes de los cuales se ha demostrado que ejercen funciones antioxidantes. Estos componentes pertenecen principalmente a la familia de los ácidos fenólicos, flavonoides y diterpenoides.

La Directiva 2010/67/EU de 20 de octubre de 2010 indica cómo se deben identificar los extractos de romero para que cumplan la normativa establecida. Establece ciertos parámetros, tales como los compuestos fenólicos que deben estar presentes en el extracto, los compuestos volátiles que se deben identificar, la densidad, la solubilidad y la pureza. El ácido carnósico ( $C_{20}H_{28}O_4$ ) y carnosol ( $C_{20}H_{26}O_4$ ) tienen que representar como mínimo el 90% del total de los diterpenos fenólicos. Borneol, acetato de bornilo, alcanfor, 1,8-cineol y verbenona deben estar presentes en el extracto como parte del aceite esencial. La densidad del extracto tiene que ser mayor a 0,25 g/ml e insoluble en agua. Respecto a la pureza no se puede encontrar cantidades superiores a 3 mg/kg y 2 mg/kg de arsénico y plomo respectivamente.

La Directiva 2010/67/EU también describe diferentes procesos permitidos para producir el extracto de romero: extracción sólido-líquido con acetona y extracción con  $CO_2$  supercrítico. También, es posible preparar un extracto etanólico de romero desodorizado, así como extractos de romero decolorados y desodorizados obtenidos a partir de la extracción de hojas de romero con hexano y etanol. Para cada uno de estos cuatro procesos la directiva establece pautas y normas diferentes.

En el caso de la obtención del extracto de romero a partir de una extracción con  $CO_2$  supercrítico la directiva establece que pueden utilizarse pequeñas cantidades de etanol como co-solvente de extracción, siendo el residuo de éste en el producto final menor al 2%. Además, la suma del contenido de ácido carnósico y carnosol debe

ser igual o mayor al 13 % en peso del extracto. Por último, la relación entre compuestos antioxidantes (ácido carnósico y carnosol) y compuestos volátiles (borneol, acetato de bornil, alcanfor, 1,8-cineol y verbenona) deberá ser igual o mayor a 15.

La cantidad máxima de extracto de romero que se puede añadir depende del producto alimentario y está regulada en la Directiva 2010/69/ EU de 22 de octubre de 2010. La Tabla 1.1 muestra la cantidad máxima de extracto de romero permitida por kg de producto, para algunos aceites comestibles.

**Tabla 1.1** Cantidad máxima de extracto de romero permitida por la Directiva 2010/69/ EU de 22 de octubre de 2010.

<b>Extracto de Romeo (E- 392)</b>	
<b>Tipo de aceite</b>	<b>Cantidad (ácido carnósico + carnosol)</b>
Aceites vegetales (excluyendo aceites vírgenes y aceite de oliva) y grasas cuyo contenido en ácidos grasos poliinsaturados sea mayor al 15 % del total de los ácidos grasos	30 mg/ kg Expresado en función de la grasa
Aceites de pescado y aceites de alga	50 mg/kg Expresado en función de la grasa
Aceites y grasas para productos tratados por calor. Aceites y grasas utilizados para freír, excluyendo el aceite de oliva y el aceite de orujo de oliva	50 mg/kg Expresado en función de la grasa

El efecto que los extractos de romero ejercen como antioxidante sobre los alimentos también lo produce en el organismo, haciendo posible la reducción del estrés oxidativo a nivel celular y por tanto ejerciendo los efectos positivos que esta reducción conlleva.

El daño o estrés oxidativo se ha definido como la exposición de la materia viva a diversas fuentes que producen una ruptura del equilibrio que debe existir entre los factores pro-oxidantes y los mecanismos antioxidantes encargados de eliminar dichas especies químicas, ya sea por un déficit de estas defensas o por un incremento de la producción de especies reactivas del oxígeno. De una manera natural, el oxígeno se encuentra en su forma más estable ( $O_2$ ), siendo poco reactivo y con una velocidad de reacción a temperatura fisiológica relativamente baja. Sin embargo por reacciones puramente químicas, enzimáticas o por efecto de las radiaciones ionizantes, se pueden producir una serie de especies químicas o sustancias pro-oxidantes (moléculas o radicales libres altamente reactivos) que son capaces de dar lugar a múltiples reacciones con otros compuestos presentes en el organismo, que llegan a producir daño celular.

En los procesos metabólicos que tienen lugar en el cuerpo humano se producen continuamente, de forma natural, especies oxidantes que constituirían una serie amenaza para la salud de no ser por las defensas naturales del cuerpo humano contra ellas. Estas defensas minimizan los efectos tóxicos de los radicales libres, pero van perdiendo eficacia con la edad. Desde los años 50 se conoce que existe una estrecha relación entre la producción de radicales libres en el metabolismo de los seres vivos y el envejecimiento fisiológico (Gerschman y col., 1954). Además la aparición de especies reactivas del oxígeno desempeña un papel importante en muchas enfermedades como la diabetes mellitus, enfermedades cardiovasculares, cáncer o enfermedades neurodegenerativas (Azizova y col., 2000; Young y col., 2001).

El sistema de defensa antioxidante está constituido por un grupo de sustancias que al estar presentes en concentraciones bajas con respecto al sustrato oxidable, retrasan o previenen la oxidación de éste. Estos sustratos oxidables son moléculas orgánicas e inorgánicas que se encuentran en las células vivas, como proteínas, lípidos, hidratos de carbono y las moléculas de ADN. Los antioxidantes impiden que otras moléculas se unan al oxígeno, al reaccionar-interactuar más rápido con los radicales libre del oxígeno y las especies reactivas del oxígeno que con el resto de moléculas presentes. La acción del antioxidante es de sacrificio de su propia integridad molecular para evitar alteraciones de moléculas (lípidos, proteínas, ADN, etc.) que son más importantes. En este sentido, el empleo de extractos de romero

como antioxidante incorporado al alimento es también objeto de investigación y desarrollo, como muestran trabajos recientes sobre la capacidad antioxidante de los extractos de romero y su vinculación directa con la salud (Bubonja-Sonje y col., 2011; Zegura y col., 2011; Visentin y col., 2012).

Por ejemplo, Posadas y col. (2009) realizaron un estudio donde se complementó la dieta con extractos supercríticos de romero con un contenido de 20 % en ácido carnósico, con el fin de observar si se reducía el estrés oxidativo en ratas de edad avanzada. El 50% de las ratas objeto de estudio fueron alimentadas durante doce semanas con croquetas (80 % de la dieta) y pechuga de pavo (20 % de la dieta), que contenía el extracto de romero en concentraciones de 0,2 y 0,02 %. Después de sacrificar a las ratas, se obtuvieron muestras del tejido del corazón y cerebro. Los extractos de romero lograron disminuir la peroxidación lipídica en los tejidos del cerebro. Los niveles de la actividad de la catalasa en el corazón también disminuyeron en el grupo tratado con los extractos. En el corazón, la óxido nítrico sintasa y en el hipocampo las especies reactivas del oxígeno disminuyeron en referencia a las ratas control.

### 1.3.1.2 Actividad antiproliferativa

Actualmente el cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo, produciendo además la mayor pérdida económica en comparación con otras enfermedades (ACS & Livestrong. The Global Economic Cost of Cancer, 2010). Por ello, las estrategias de tratamiento y prevención del cáncer no sólo podrían ir encaminadas a mejorar la salud de la población sino también disminuir el gasto sanitario.

En los últimos años, diferentes estudios indican que varios componentes naturales que están incluidos en la dieta y derivados de plantas tienen capacidad para prevenir, revertir y/o inhibir algunos procesos de carcinogénesis antes del desarrollo del cáncer invasivo (Lila, 2007; Vainio y Weiderpass, 2006). Además, al contrario que los fármacos, anticancerígenos actuales y utilizados comúnmente, presentan generalmente poca o ninguna toxicidad y bajo coste, apuntándose, por tanto, como agentes terapéuticos prometedores y rentables para el tratamiento del cáncer, ya sea solos o en combinación con otros agentes. Entre estos compuestos naturales, han sido ampliamente estudiados compuestos como los polifenoles del té verde, la cúrcuma, el resveratrol, la luteolina, la genisteína, el licopeno, el ácido elágico y el lupeol (González-Vallinas y col., 2012).

Recientemente el interés e investigación en biomedicina por relacionar las propiedades biológicas de los componentes del romero y el cáncer ha aumentado considerablemente. Existen también referencias bibliográficas donde se muestran que los extractos de romero presentan propiedades como hepatoprotector, antioxidante, antiviral, antimicrobiana y estimulante del sistema nervioso central, entre otras, y algunas de estas actividades biológicas apuntan a un efecto beneficioso prometedor de romero en el control del desarrollo del cáncer. Especialmente, la actividad antioxidante de los extractos de romero, debido a los compuestos antioxidantes que contiene, ácido cafeico, ácido rosmarínico, ácido ursólico, ácido carnósico y carnosol, ha sido muy valorada en el efecto antiproliferativo (Auroma y col., 1992; Frankel y col., 1996; Al-Sereiti y col., 1999; Moran y col., 2005; Costa y col., 2007; Anderson y col., 2008).



En los últimos 15 años se pueden encontrar en la base de datos Pubmed cuarenta y dos estudios que hablan acerca del tema (Ngo y col., 2011). De los cuarenta y dos estudios encontrados, ocho presentaron resultados *in vivo*, y seis de ellos utilizaron el extracto de romero completo. Los efectos anticancerígenos del extracto de romero resultaron ser estadísticamente significativos en cinco de los seis estudios (Ngo y col., 2011).

El NIH (*National Institute of Health*) de EEUU define los parámetros que permiten establecer (medir) la actividad antiproliferativa de una sustancia sobre líneas celulares específicas. La GI50 (*Growth Inhibition 50*) se define como la concentración del compuesto que causa la inhibición del 50 % en el crecimiento de las células cancerosas con respecto a las células control, considerando el tiempo 0. En forma similar, el parámetro IC50 (*Inhibitory Concentration 50*) representa la concentración de la sustancia capaz de reducir el crecimiento de las células en un 50 % con respecto a las células control. Por otro lado, la TGI (*Total Growth Inhibition*) es la concentración requerida para detener completamente el crecimiento de las células tratadas.

No existen en bibliografía datos que indiquen valores mínimos de GI50, IC50 y TGI para considerar que un extracto pueda ser considerado antiproliferativo como tal. Únicamente hay estudios preliminares realizados por el Instituto Nacional del Cáncer (NCI) sobre diferentes extractos de plantas en los que se determinó mediante un screening de extractos crudos que una IC50 mínima de 30 µg/mL era suficiente para considerarlo activo y proseguir con el proceso de purificación.

## **1.4 Tecnologías de producción de extractos de romero con actividad antioxidante**

### **1.4.1 Extracción con disolventes líquidos**

La extracción sólido-líquido (ESL) es un proceso de extracción muy antiguo basado en el contacto directo de un sólido con un líquido en el cual son solubles algunas de las sustancias presentes en el sólido. El producto de este proceso es una mezcla formada por el disolvente empleado y los compuestos disueltos en él.

Diferentes técnicas convencionales como la ESL, la hidrodestilación o la destilación por arrastre con vapor han sido ampliamente utilizadas en la obtención de extractos naturales a partir de plantas aromáticas para obtener diferentes tipos de compuestos (Almela y col., 2006; Herrero y col., 2005; Dragan y col., 2008; Zhang y col., 2012). De todos ellos se demuestra que tanto la técnica como el disolvente empleado ejercen un efecto importante en el rendimiento de extracción como en el tipo de compuestos obtenidos. Tavassoli y col., (2011) utilizaron la extracción Soxhlet para obtener extractos metanólicos de hojas de romero y los extractos presentaban capacidad antioxidante y antimicrobiana. En este mismo trabajo exponen que según Liue y col., (2007) los extractos metanólicos tienen mayor contenido en compuestos fenólicos y flavonoides que los extractos llevados a cabo con hexano. Mohammad y col., (2010) caracterizaron un extracto de romero producido en una extracción sólido-líquido con un 80 % de metanol identificando hasta 38 compuestos fenólicos. En la lista destacan compuestos como el ácido rosmarínico, carnosol, ácido carnósico, ácido gálico, ácido caféico, epirosmanol, luteolín, etc.

Desde un punto de vista de las aplicaciones alimentarias, agua, etanol o sus mezclas, son los disolventes polares permitidos. Si bien los rendimientos de la ESL de romero utilizando agua o etanol son altos, la selectividad del proceso para extraer los compuestos antioxidantes no es muy elevada. Esto se debe a que el antioxidante mayoritario del romero es el ácido carnósico, y esta sustancia es poco polar y más soluble en disolventes parafínicos que en alcoholes. La Tabla 1.2 compara los rendimientos de extracción y la concentración de compuestos antioxidantes, determinados para la ESL de hojas de romero utilizando un disolvente polar (etanol)

y un disolvente parafínico (hexano). Las extracciones se llevaron a cabo a 50 °C, durante 24 h, utilizando 1 g de hojas de romero y 100 mL de disolvente. Tal como puede observarse en la tabla, el rendimiento de extracción con etanol es casi tres veces mayor que el obtenido cuando se utiliza hexano. Sin embargo, la concentración de ácido carnósico en el extracto etanólico es aproximadamente la mitad que la determinada en el extracto obtenido con hexano.

**Tabla 1.2.** Rendimientos y cantidad de ácido carnósico obtenidos utilizando diferentes disolventes.

	Rendimiento (%)	Ácido carnósico (% en peso)
Etanol	20,66	12,36
Hexano	7,39	24,61

Otros aspectos no muy favorables de la ESL son el alto consumo de disolvente, los elevados tiempos de extracción, la temperatura que se emplea y el alto coste energético para evaporar el disolvente, así como la aparición de productos de oxidación (Sebastian y col., 1992). Por estos motivos, se está haciendo verdaderos esfuerzos para encontrar otras alternativas tecnológicas que puedan contrarrestar todos los aspectos negativos de la ESL.

Uno de los intentos para mejorar la ESL ha sido el empleo de ultrasonidos durante la extracción. Paniwnyk y col., (2009) estudiaron el efecto de los ultrasonidos sobre la extracción antioxidantes de hojas de romero utilizando diferentes disolventes. Los resultados indican que, en comparación con la extracción convencional, el uso de ultrasonidos produce una extracción más eficaz, con rendimientos mayores y a temperaturas más moderadas.

Un método de extracción alternativo es el empleo de un líquido presurizado como disolvente de extracción. En la extracción con líquidos presurizados (PLE: *pressurized liquid extraction*) se utilizan disolventes a temperaturas superiores al punto de ebullición del disolvente, pero a una presión lo suficientemente alta como para mantenerlo en su estado líquido. La temperatura empleada en el proceso, normalmente alta, aumenta la capacidad del disolvente para solubilizar los analitos.

En estas condiciones, la velocidad de difusión de los analitos hacia el disolvente aumenta y la viscosidad disminuye, favoreciéndose así la difusión de los analitos a través de la matriz sólida. La alta temperatura también permite romper más fácilmente las interacciones soluto-matriz y extrayéndose así una mayor cantidad de analitos. Estas características hacen que en la extracción PLE puedan emplearse menores cantidades de disolventes y menores tiempos de extracción en comparación con la ESL (Richter y col., 1996). Por otro lado, las presiones elevadas también contribuyen a acelerar el proceso de extracción, al producirse un contacto más íntimo entre el disolvente y los analitos, y una mayor penetración del disolvente en el interior de la matriz sólida.

Por tanto, el uso combinado de temperaturas y presión elevadas permite extracciones más rápidas y completas, con un considerable ahorro de disolvente, así como una buena reproducibilidad y mayores rendimientos de extracción en comparación con la extracción sólido-líquido tradicional. Debido a estas ventajas, desde hace varios años se está utilizando la PLE en diferentes áreas como la biología, la industria farmacéutica y la industria alimentaria (Carabias-Martínez y col., 2005). En el campo de los alimentos, esta técnica se ha empleado tanto para la extracción y aislamiento de compuestos bioactivos así como para la eliminación de contaminantes.

La empresa Dionex patentó un equipo con el nombre ASE (accelerate solvent extraction) que dio un impulso muy fuerte a la técnica de PLE, permitiendo trabajar de una forma automatizada con líquidos presurizados.

La Tabla 1.3 muestra los resultados de la extracción ASE de 1 g de hojas de romero llevada a cabo a 150°C, durante 10 minutos y utilizando únicamente 20 mL de disolvente. Tal como en la ESL (Tabla 1.2.), los rendimientos de extracción son considerablemente mayores cuando se utiliza un disolvente polar (etanol) en comparación con el hexano, pero la concentración de antioxidantes en el extracto es significativamente mayor en el caso del disolvente parafínico.

**Tabla 1.3.** Extracción ASE de 1 g de hojas de romero. Temperatura 150°C; tiempo de extracción 10 min; 20 mL de disolvente.

	Rendimiento	% en peso		
	(%)	ácido rosmarínico	carnosol	ácido carnósico
Etanol	45,84	2,486	0,248	4,63
Hexano	13,68	----	0,956	13,41

Son varios los autores que han utilizado la extracción con líquidos presurizados (PLE) para la obtención de antioxidantes de las hojas de romero (Herrero y col., 2010; Borrás-Linares, 2011).

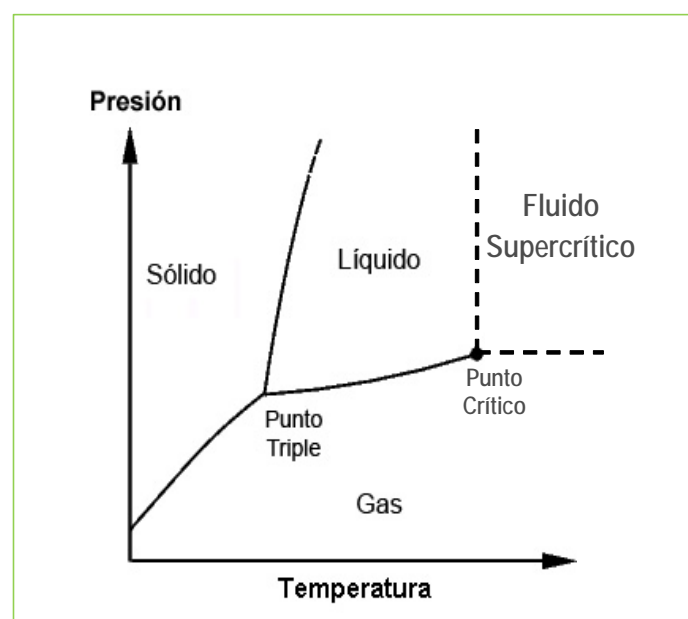
Herrero y col. (2010) compararon tres técnicas diferentes de extracción para la obtención de antioxidantes procedentes de las hojas de romero: PLE (utilizando etanol y agua como disolventes), extracción supercríticas (SFE) y la extracción con agua y formación de partículas en línea (proceso WEPO). Los rendimientos de extracción fueron los más elevados para las extracciones PLE, llegando hasta un 38 % a 200°C, tanto si empleaban el etanol o el agua como disolvente.

## 1.4.2 Extracción con fluidos supercríticos

### 1.4.2.1. Los fluidos supercríticos

Hace más de un siglo, en 1869, Thomas Andrews en sus estudios con  $\text{CO}_2$  a alta presión, a distintas temperaturas, reconoció por primera vez la existencia del punto crítico. En dicho punto desaparecía la interfase entre el estado gaseoso y el estado líquido. Además, Andrews sugirió que para cada gas existía una temperatura crítica particular. Posteriormente, Hannay y Hogart en 1879, estudiaron la solubilidad de distintos sólidos (sales metálicas) en gases en condiciones de presiones superiores a su presión crítica y temperaturas superiores, pero cercanas, a su temperatura crítica (fluidos supercríticos (FSC)). Estos trabajos constituyen los inicios de la investigación sobre las propiedades y aplicaciones de los fluidos supercríticos. Sin embargo, hasta los años cincuenta no aparecen estudios sobre aplicaciones industriales, concretamente para eliminar las fracciones ligeras del residuo de la destilación del crudo. A partir de los años 70, la aplicación de los fluidos supercríticos en la industria agroalimentaria es uno de los focos de atención más importantes de la comunidad científica.

En el diagrama de fases que se muestra en la Figura 1.7, se indica la región de un FSC en relación con la fase líquida, sólida y gas de una sustancia pura, en función de la presión y temperatura.



**Figura 1.7:** Diagrama de Fases de una sustancia pura.

Como es bien conocido, un fluido en condiciones supercríticas tiene propiedades intermedias entre las de un gas y las de un líquido (Tabla 1.4). Densidad, viscosidad, difusividad y tensión superficial, son las propiedades físicas más importantes que definen las características de los FSCs. Estas propiedades pueden variar significativamente por pequeños cambios en la presión y la temperatura y, consecuentemente, afectar al proceso de separación o reacción en condiciones supercríticas.

La Tabla 1.4 muestra que la densidad de un FSC es del orden de 100 a 1000 veces mayor que la de un gas y comparable a la de un líquido. Como consecuencia, las propiedades de solvatación son similares a las de los líquidos; el poder disolvente depende de esta capacidad de solvatación, y por tanto depende de la densidad. En la zona más próxima al punto crítico se producen las mayores variaciones de densidad y por tanto, pequeños cambios de presión y/o temperatura en esta zona producen grandes variaciones del poder disolvente de un FSC.

**Tabla 1.4:** Propiedades físicas de un gas, líquido y FSC.

	<b>Densidad</b> <b>(g·ml<sup>-1</sup>)</b>	<b>Viscosidad</b> <b>(g·cm<sup>-1</sup>·s<sup>-1</sup>)</b>	<b>Difusividad</b> <b>(cm<sup>2</sup>·s<sup>-1</sup>)</b>
<b>Gas</b>	$(0,1 - 2) \times 10^{-3}$	$(0,5 - 3,5) \times 10^{-4}$	0,01 - 1
<b>FSC</b>	0,2 - 1,0	$(0,2 - 1,0) \times 10^{-3}$	$(3,3 - 0,1) \times 10^{-4}$
<b>Líquido</b>	0,6 - 1,6	$(0,5 - 3,0) \times 10^{-2}$	$(0,2 - 2,0) \times 10^{-5}$

A temperatura constante, la densidad y por tanto la fuerza solvente, aumentan con el incremento de presión hasta llegar a un máximo, diferente para cada soluto. Pero la solubilidad de un soluto en un FSC no depende sólo de la capacidad de solvatación, sino también de la presión de vapor del soluto. Así, respecto a variaciones de temperatura, a presiones moderadas la solubilidad de un soluto en un FSC aumenta cuando disminuye la temperatura, debido al aumento de la densidad del mismo. Sin embargo, a presiones altas el aumento de temperatura produce un aumento de solubilidad, debido en este caso al aumento de la volatilidad del soluto.

La viscosidad de los FSCs es menor que la de los líquidos (Tabla 1.4) lo que favorece la transferencia de materia y la eficacia de los procesos de extracción, así como la disminución de los tiempos de extracción. La viscosidad depende de la presión y de la temperatura a la que se encuentra el fluido, aumentando al disminuir la temperatura y al aumentar la presión.

En cuanto a la difusividad, el coeficiente de difusión en un FSC es al menos un orden de magnitud mayor que el de los líquidos, lo que también favorece los procesos de transferencia de materia y por tanto los procesos de extracción. La difusividad en un FSC disminuye al aumentar la presión y aumenta al aumentar la temperatura, siendo esta variación más importante en las cercanías del punto crítico. Por otro lado, los valores de tensión superficial de un FSC son bajos, lo que facilita la penetrabilidad del fluido a través de matrices sólidas, constituyendo una gran ventaja frente a los disolventes líquidos en los procesos de extracción.

Indiscutiblemente el FSC que más se utiliza es el dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) por poseer una serie de ventajas como una presión crítica (72,90 bar) y temperatura crítica (31,05 °C) moderadas, un alto poder disolvente, no ser tóxico ni inflamable, ser relativamente económico y, particularmente en las aplicaciones alimentarias, por ser una fluido permitido en los alimentos y ser reconocido como GRAS (*Generally Recognized as Safe*).

El principal inconveniente que presenta el empleo de  $\text{CO}_2$  en SFE es su baja polaridad, lo que dificulta la solubilización de las sustancias polares. Este problema se soluciona mediante el empleo de co-solventes (Schoenmakers y col., 1987), disolventes orgánicos que se añaden al FSC en pequeñas cantidades (generalmente no más de un 10-20 % v/v) con el fin de aumentar la polaridad del mismo. Existe una gran variedad de disolventes líquidos que se han utilizado como co-solvente del  $\text{CO}_2$ , tales como tetrahidrofurano, dimetil sulfóxido, hexanol, propanol-2-ol, 2 metoxietanol, agua, ácido fórmico, etc. (Smith, 1999), aunque en la industria alimentaria no están todos permitidos y, por lo tanto, en la mayoría de las aplicaciones alimentarias se utiliza únicamente agua o etanol.

Las características de los FSCs hacen que su utilización como agentes de extracción presente una serie de ventajas respecto a las técnicas de extracción convencionales como la hidrodestilación, extracción por arrastre con vapor, o

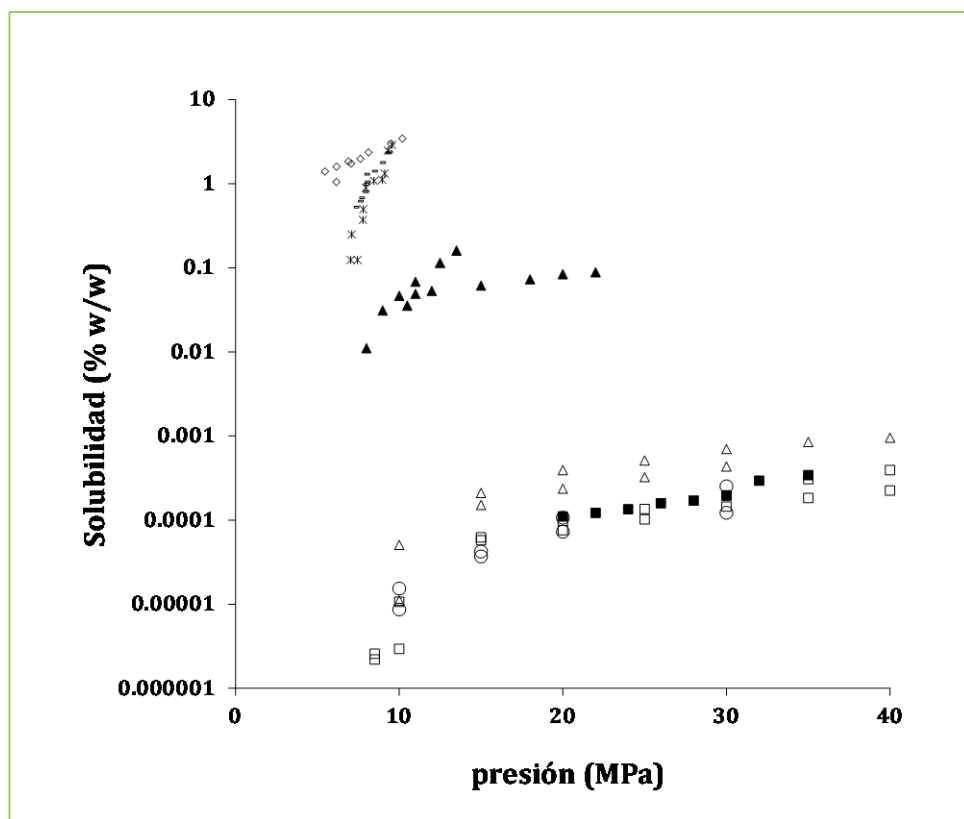


extracción con disolventes orgánicos. Diferentes autores (Ibáñez y col., 2003; Carvalho y col., 2005; Reverchon y col., 1992) han estudiado las diferencias entre los extractos supercríticos de romero y los extractos obtenidos mediante disolventes líquidos (etanol y hexano) y/o hidrodestilación, concluyendo que los extractos supercríticos, en general, presentan mejores actividades biológicas que los obtenidos por técnicas convencionales.

La extracción con fluidos supercríticos (SFE) es una técnica limpia, rápida y segura, con nulo o mínimo empleo de disolventes líquidos. La selectividad de la extracción se puede ajustar variando únicamente la densidad del fluido, es decir, controlando las variables presión y temperatura. Además, utilizando CO<sub>2</sub> como FSC, se puede llevar a cabo con temperaturas moderadas y en condiciones no oxidantes por lo que se puede emplear para extraer compuestos termolábiles y fácilmente oxidables. Además de las ventajas citadas anteriormente, la posibilidad de realizar un fraccionamiento de los compuestos extraídos mediante la despresurización en etapas, lo que se denomina precipitación selectiva, la reutilización del FSC en diferentes procesos suponiendo un alto ahorro de costes, y la eliminación del fluido del extracto por simple descompresión, hace que el empleo de esta tecnología como técnica de extracción sea aún más interesante.

La solubilidad de un compuesto fitoquímico en CO<sub>2</sub> supercrítico, varía en función del tipo de compuesto. En general la solubilidad de los monoterpenos hidrocarbonados es mayor que la solubilidad de los monoterpenoides. Por ejemplo, la solubilidad del limoneno a 9,6 MPa y 50 °C es 2,9 % w/w. En las mismas condiciones, la solubilidad de timol y alcanfor son, respectivamente 0,9 y 1,6 % w/w (Gupta y Shim, 2007). Estos valores son además considerablemente superiores a los de otros compuestos extraídos presentes en plantas tales como compuestos fenólicos, ceras, carotenoides y clorofilas. Murga y col., (2002) estudiaron la solubilidad en CO<sub>2</sub> supercrítico (0-50 MPa y 40-60 °C) de dos de los compuestos fenólicos presentes en las uvas como el galato de metilo y el ácido protocatecuico y las solubilidades fueron menores a 0,02 % w/w. En el trabajo, además, se reportó las bajas solubilidades de diferentes carotenoides (Shia y col., 2007).

La Figura 1.8 muestra la solubilidad en CO<sub>2</sub> supercrítico de diferentes sustancias que representan a las diferentes familias de compuestos presentes en la materia vegetal.



**Figura 1.8.** Solubilidad en CO<sub>2</sub> supercrítico de diferentes constituyentes de la materia prima de vegetal. Aceites esenciales: (\*) limoneno, (-) α-pineno and (◇) linalol; compuesto fenólicos: (○) ácido protocatecuico, (△) galato de metilo y (□) ácido *p*-cumárico; pigmentos: (■) β-caroteno; ceras: (▲) *n*-C<sub>28</sub>H<sub>58</sub>. Rango de temperaturas: 35-50 °C.

La solubilidad de los diferentes compuestos representada en la Figura 1.8 está expresada en función de la presión para temperaturas entre 35 y 50°C. En particular, la figura muestra la solubilidad de algunos monoterpenos presentes en los aceites esenciales: α-pineno, limoneno y linalol; la solubilidad de algunos compuestos fenólicos de bajo peso molecular como el ácido protocatecuico, galato de metilo y ácido *p*-cumárico y la solubilidad del β-caroteno y del alcano C<sub>28</sub>, representando, respectivamente, pigmentos y ceras.

Como se puede observar en la figura, la solubilidad de los compuestos del aceite esencial es mayor que la de los compuestos fenólicos. Es decir, a bajas presiones de extracción se favorecería la extracción selectiva del aceite esencial frente a compuestos fenólicos. Por otro lado, la solubilidad de las ceras es similar a la de los monoterpenos, por lo que presiones de extracción algo mayores supondrán una co-extracción de éstas con el aceite esencial.

Las aplicaciones de los FSC en la industria alimentaria tienen una gran variabilidad, tanto por las condiciones empleadas como por la materia prima de partida. Desde las primeras patentes que corresponden a la descafeinización de café y datan de 1974 (Roselins y col., 1974; Zosel 1974) hasta aplicaciones más recientes como la extracción de aceites esenciales (Abbasi y col., 2008), el fraccionamiento y desacidificación de aceites y grasas (Klicia y col., 2010), la extracción de lúpulo (Gil-Ramírez y col., 2012). Como ejemplo la Tabla 1.5 muestra las aplicaciones de SFE para la obtención de aceites esenciales de plantas.

**Tabla 1.5.** SFE de diferentes hierbas y plantas para la obtención de aceites esenciales.

<b>Materia Prima</b>	<b>Nombre botánico</b>	<b>Referencias</b>
Anís verbena	<i>Lippia alba</i>	Stashenko y col., 2004; Braga y col., 2005
Anís	<i>Pimpinella anisum</i>	Rodrigues y col., 2013
Artemisa	<i>Artemisia sieberi</i>	Gashemi y col., 2007
Hojas de Albahaca	<i>Ocimum basilicum</i>	Menaker y col., 2004
Anacardo	<i>Anacardium occidentale</i>	Patel y col., 2006
Manzanilla	<i>Chamomilla recutita</i>	Kotnik y col., 2007
Clavo	<i>Eugenia caryophyllata Thunb</i>	Ivanovica y col., 2011
Cilandro	<i>Coriandrum sativum</i>	Grosso y col., 2008
Eucalipto	<i>Eucalyptus camaldulensis</i> <i>Dehnh.</i>	Francisco y col., 2001
Hinojo	<i>Foeniculum vulgare Mill.</i>	Damjanovik y col., 2006
Hisopo	<i>Hyssopus officinalis</i>	Kazazi y col., 2007
Hojas de Laurel	<i>Laurus nobilis</i>	Careda y col., 2002
Lavanda	<i>Lavandula angustifolia</i>	Da Porto y col., 2009
Macela	<i>Achyrocline alata, A.</i> <i>satureioides</i>	Leal y col., 2006
Mirtus	<i>Myrtus communis</i>	Ghasemi y col., 2011
Caléndula	<i>Calendula officinalis</i>	Danielski y col., 2007
Mejorana	<i>Origanum majorana</i>	Rodrigues y col., 2003
Menta	<i>Mentha spicata insularis</i>	Danielski y col., 2007
Orégano	<i>Origanum vulgare</i>	Ivanovica y col., 2011
Pimienta negra	<i>Piper nigrum</i>	Aghel y col., 2004
Romero	<i>Rosemary officianlis</i>	Vicente y col., 2012
Salvia	<i>Salvia officinalis</i>	Ferreira y col., 1999
Salvia	<i>Salvia mirzayanii</i>	Glisic y col., 2010
Anís estrellado	<i>Illicium anisatum</i>	Yamini y col., 2008
Tomillo	<i>Thymus vulgaris</i>	Stashenko y col., 2004
Tomillo	<i>Thymus Zygis</i>	Della Porta y col., 1998
Valeriana	<i>Valeriana officinalis</i>	Zizovic y col., 2007

#### 1.4.2.2. Factores que afectan a la extracción supercrítica

Además de las características propias de cada planta, el origen de la materia prima vegetal es un factor muy importante en los procesos de extracción. Existen numerosos trabajos que describen la extracción supercrítica de hojas de romero para obtener compuestos antioxidantes y en los cuales el origen de la materia prima es un factor determinante (Chang y col., 2008; Visentin y col., 2011; Cavero y col., 2005; Celiktas y col., 2007). Por ejemplo, Carvalho y col., (2005) llevaron a cabo un estudio de SFE con un cultivo orgánico de romero de origen brasileño (Sao Paulo) aplicando diferentes condiciones de temperatura y presión de extracción. A 30 MPa y 40 °C, utilizando CO<sub>2</sub> puro y sin llevar a cabo ningún tipo de fraccionamiento, obtuvieron un extracto con un porcentaje en peso de ácido carnósico cercano a 20 % en peso. Yesil-Celiktas y col., (2007) llevaron a cabo sus estudios con diferentes lotes de romero de la zona de Turquía, cultivados en diferentes épocas del año. A 35 MPa, 100 °C y con 5 % de metanol como co-solvente, obtuvieron extractos en los cuales la concentración de ácido carnósico variaba entre 0,5 y 11,6 % en peso. Por otra parte, Chang y col. (2008) realizaron sus experimentos con plantas de romero cultivadas en campos experimentales de Taiwán, explorando presiones entre 20-35 MPa y temperaturas de 40-70 °C. Los mejores resultados obtenidos en cuanto a la concentración de antioxidantes se obtuvieron a 35 MPa y 70 °C. Independientemente del origen del romero, todos los autores coinciden en utilizar presiones de 30-35 MPa para producir extractos de romero con alta concentración de antioxidantes.

Otro factor importante a tener en cuenta a la hora de realizar la extracción de una matriz vegetal es la parte de la planta que se quiere emplear como materia prima. Distintos trabajos han puesto de manifiesto que la composición de las diferentes partes de una misma planta, hojas, pétalos, tallos, etc..., pueden dar lugar a extractos totalmente diferentes. Por ejemplo Bako y col., (2002) investigaron la composición de los carotenoides en diferentes partes de la planta de *Caléndula Officinalis*: tallo, hojas, pétalos y polen. Los carotenoides mayoritarios en cada parte de la planta no fueron los mismos. En los pétalos y el polen los carotenoides mayoritarios fueron la flavoxantina y auroxantina, mientras que en el tallo y hojas fueron la luteína y  $\beta$ -caroteno. En el caso del romero, la bibliografía más abundante se centra en la extracción de las hojas, dónde se han encontrado las mayores concentraciones de compuestos fenólicos.

El secado de la materia prima es también una operación importante que puede influir en el resultado de la extracción supercrítica. A pesar del carácter lipofílico de algunos compuestos, como el aceite esencial o terpenoides, el agua presente en la matriz vegetal puede interferir en la interacción soluto-CO<sub>2</sub> disminuyendo el rendimiento. Así, la matriz vegetal no debe tener un contenido de agua superior al 12 %. El agua puede causar además efectos indeseables como la formación de hielo en las tuberías del equipo o la hidrólisis de ciertos compuestos. Oca y col., (1999) estudiaron la influencia de diferentes tipos de secado sobre la composición de extractos supercríticos de romero. Estudiaron tres métodos diferentes de secado: la evaporación, la liofilización y el secado en un rota vapor, llegando a la conclusión de que la mayor cantidad de aceite esencial se obtiene cuando se utiliza la liofilización debido a las bajas temperaturas del proceso, puesto que se produce una pérdida menor de compuestos aromáticos.

La disrupción celular y el tamaño de partícula pueden ser otros factores determinantes en el resultado de la extracción. Los compuestos del aceite esencial se encuentran en espacios intracelulares, por lo que con el fin de favorecer un mayor contacto con el disolvente, el tratamiento previo de molienda o trituración es muy favorable, aumentando la eficacia del proceso al disminuir la resistencia a la transferencia de masa y aumentando así la velocidad y el rendimiento de la extracción. Ambas variables están relacionadas también con el flujo de CO<sub>2</sub> necesario para una buena extracción.

Damjanovic y col., (2006) observaron como una disminución de las partículas de hinojo de 1,48 mm a 0,98 mm produjo un aumento significativo en el rendimiento de la fracción que contenía el aceite esencial (de 2,15 % a 4,2 %). En las operaciones que se realizan para reducir el tamaño de partícula es importante controlar también el calor que se genera durante el proceso. En la molienda, se pueden producir aumentos de temperatura muy importantes (Singh y col., 1997) que dan lugar a pérdidas del aceite esencial y/o degradación de sustancias termolábiles. Estos efectos indeseables pueden disminuirse mediante la molienda criogénica, en la cual se utiliza nitrógeno o dióxido de carbono líquido durante el proceso. Meghwal y Goswami (2010) presentaron un estudio comparando la molienda a temperatura ambiente con la molienda criogénica de pimienta negra. Se demostró que el contenido de aceite

esencial obtenido después de la molienda criogénica fue mayor (aproximadamente 1,98-2,15 ml / 100 g de polvo) que el obtenido con una molienda a temperatura ambiente (0,87-0,96 ml / 100 g de polvo).

Debido a las altas presiones que se utilizan en SFE, la agitación mecánica es difícil de lograr. Por lo tanto, la aplicación de ultrasonidos puede ayudar a la extracción produciendo beneficios importantes para la mejora de los procesos de transferencia de masa.

El uso de ultrasonidos para mejorar el rendimiento de extracción se inició en la década de 1950. Tradicionalmente, la extracción con disolventes asistida por ultrasonidos se ha usado ampliamente para la extracción de ingredientes alimentarios tales como lípidos, proteínas, aceites esenciales, flavonoides, carotenoides y polisacáridos. En comparación con los métodos tradicionales de extracción con disolventes, la adición de ultrasonidos puede mejorar la velocidad y rendimiento de extracción, permitiendo además disminuir la temperatura de extracción (Vilkhu y col., 2008)

En la extracción de plantas y hierbas, la aplicación de ultrasonidos puede producir importantes mejoras (Chemat y col., 2011). Los ultrasonidos causan varios efectos físicos, tales como turbulencia, aglomeración de partículas o disrupción celular. Estos efectos derivan principalmente del fenómeno conocido como cavitación, es decir, la formación, el crecimiento y violento colapso de micro burbujas debido a fluctuaciones de presión que genera la onda sonora. La cavitación en la extracción sólido-líquido convencional está bien establecida. Sin embargo, en el caso de los disolventes a presión, la intensidad requerida para producir cavitación aumenta, y por lo tanto, se espera que el efecto de la aplicación de ultrasonidos a los procesos de alta presión sea mucho más limitada (Vinatoru, 2001)

Son varios los ejemplos que se encuentran de SFE asistida con ultrasonidos. Riera y col., (2010) estudiaron el efecto de los ultrasonidos en la extracción supercrítica de aceite de almendras. Se llevaron a cabo diferentes extracciones a diferentes presiones, temperaturas, tiempos y flujos de CO<sub>2</sub>. A presiones cercanas a 20 MPa, el aumento en el rendimiento de extracción fue bajo (15 %), posiblemente debido a la baja solubilidad del aceite de almendras en CO<sub>2</sub> supercrítico en esas

condiciones. Sin embargo, a altas presiones de extracción, se observaron mejoras considerables en el aumento de rendimiento obtenido (alrededor de 40-90 %).

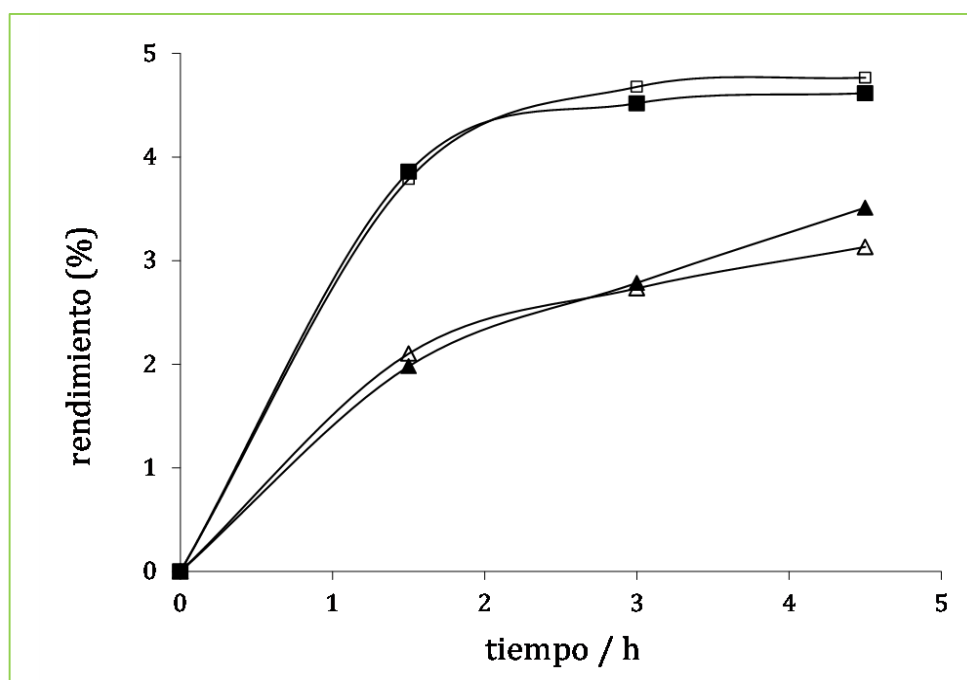
El objetivo que se persigue en una extracción supercrítica, es decir, el tipo de compuestos que se desean extraer de una matriz, condiciona en gran medida las variables temperatura y presión que se han de utilizar en el proceso. Por ejemplo, si el objetivo es un aceite esencial, la mayoría de los compuestos son termolábiles, por lo que se debe trabajar a temperaturas entre 35 y 50 °C para evitar posibles degradaciones.

Los aceites esenciales pueden ser extraídos fácilmente usando presiones y temperaturas moderadas (Figura 1.10). Sin embargo, también son aplicadas presiones altas de extracción para favorecer la compresión celular y mejorar la transferencia de masa y liberación del aceite esencial de la célula. Estas altas presiones producen la co-extracción de sustancias distintas al aceite esencial.

Como regla general, se puede decir que cuanto mayor es la presión, mayor es el poder disolvente y menor es la selectividad del proceso de extracción. Por lo tanto, en el caso de los aceites esenciales, cuando se aplican presiones altas es necesario llevar a cabo un fraccionamiento en al menos dos separadores. Por ejemplo, Fornari y col., (2012) observaron que las altas presiones aumentan significativamente el rendimiento de extracción supercrítica de hojas de orégano, mientras que la concentración de aceite esencial en el extracto disminuye considerablemente.

Como se ha dicho anteriormente, las características propias de cada planta es un factor determinante en la extracción supercrítica, y por lo tanto en la cinética de la misma. Fornari y col., (2012) compararon la cinética de extracción de diferentes plantas pertenecientes a la familia de las labiadas. En este trabajo, las condiciones fueron iguales para todas las plantas: tratamiento previo, tamaño de partícula, empaquetamiento y condiciones de extracción (30 MPa, 40 °C). La Figura 1.9 muestra la comparación entre los rendimientos totales de extracción obtenidos para cada planta en función del tiempo de extracción. Se puede observar en la figura como la salvia (*Salvia officinalis*) y el orégano (*Origanum Vulgare*) se extraen completamente en menos de 2h mientras que el romero (*Rosmarinus Officinalis*) y tomillo (*Thymus Zygis*) después de 4,5 h no se han extraído completamente.





**Figura 1.9.** Extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico (30 MPa and 40 °C) de orégano (□), salvia (■), tomillo (△) y romero (▲).

Por último, el fraccionamiento del extracto puede ser un procedimiento eficaz para concentrar selectivamente los compuestos que se estén buscando. Por ejemplo, se pueden recoger los compuestos fenólicos en una fracción y así obtener un producto con mejor capacidad antioxidante.

El fraccionamiento del extracto puede llevarse a cabo de dos modos diferentes: mediante una extracción en etapas, aplicando diferentes condiciones de presión y temperatura de extracción en cada etapa, o mediante un fraccionamiento en línea producido a través de una despresurización en cascada. Por ejemplo Ibáñez y col., (1999) utilizaron el fraccionamiento secuencial (en etapas) para obtener los compuestos más volátiles (el aceite esencial del romero) en una primera etapa a 10 MPa y 40 °C, mientras que en una segunda etapa a 40 MPa y 50 °C se obtuvo una fracción de los compuestos más pesados. Ivanovic y col. (2009) llevaron a cabo un fraccionamiento muy similar en el que en una primera etapa a 11,5 MPa y 40 °C extrajeron el aceite esencial, cambiando a continuación las condiciones de extracción a 30 MPa y temperaturas entre 40-100 °C para obtener la fracción más antioxidante.

El fraccionamiento en línea consiste en un proceso de una única etapa de extracción donde se lleva a cabo una despresurización en cascada del material

extraído en dos o más separadores. Las diferentes condiciones de presión y temperatura aplicadas en cada uno de los separadores permiten una precipitación selectiva de los compuestos. Cavero y col., (2005) llevaron a cabo un proceso de fraccionamiento en línea con dos separadores. Las diferentes extracciones se llevaron a cabo entre 15 - 30 MPa y 40 - 50 °C con porcentajes de co-solvente (etanol) entre 0 y 7 %. La fracción antioxidante fue recogida en el primer separador con presiones entre 7,5 y 14 MPa, mientras que los compuestos volátiles fueron recogidos en un segundo separador donde la presión se mantuvo a 2 MPa.

### 1.4.3. La cromatografía supercrítica

La cromatografía se define como un método físico de separación basado en la interacción de un analito con una fase móvil y una fase estacionaria. Concretamente en este tipo de cromatografía la fase móvil es un fluido supercrítico. La cromatografía con fluidos supercríticos (SFC) se concibió como un método cromatográfico alternativo o complementario a la cromatografía de gases (GC) y a la cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC). La GC es una técnica eficaz y rápida pero el análisis se realiza para compuestos térmicamente estables debido a las altas temperaturas que se utilizan. La cromatografía de líquidos es muy versátil y se emplea para una gran variedad de compuestos pero los tiempos de análisis son elevados al igual que el uso de disolventes, sobre todo en escala preparativa. Debido las propiedades intrínsecas de un fluido supercrítico, su empleo como fase móvil permite llevar a cabo la separación aprovechando el elevado coeficiente de difusión, propio de los gases, y el elevado poder de solvatación, característico de los líquidos, para obtener una separación con alta resolución, a bajas temperaturas, con tiempos de análisis moderados y en ausencia de disolventes orgánicos.

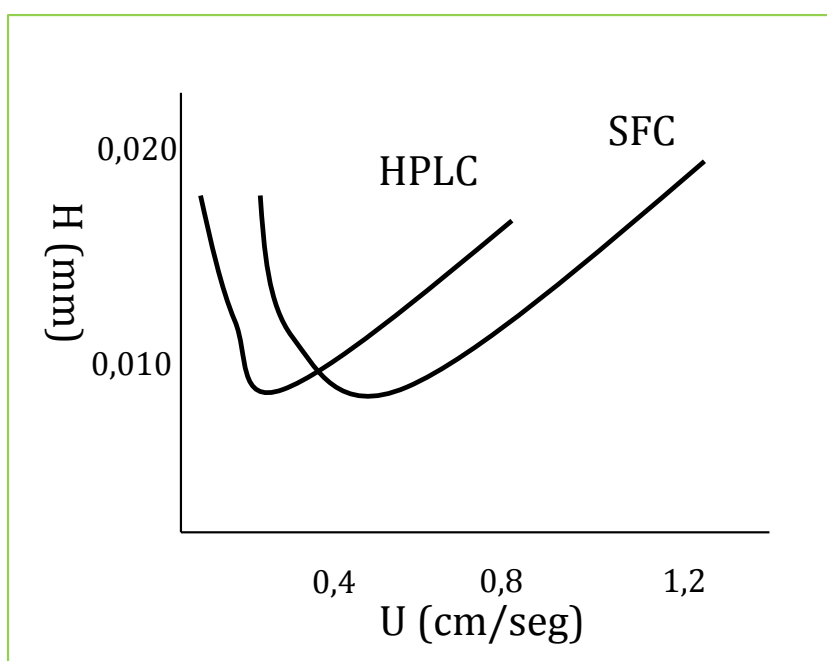
Klesper, Corwin y Turner pueden ser considerados los padres de la SFC ya que en 1962 describieron los primeros procesos de separación de derivados termolábiles de la porfina utilizando clorofluorometano supercrítico como fase móvil a presiones de hasta 14 MPa y temperaturas entre 150 a 170 °C (Klesper y col., 1962). Desarrollaron un método tanto a nivel teórico como experimental y fue utilizado como base por otros investigadores en la década de 1960 (Giddings y col., 1969; Sie y col., 1967). Pero realmente, el máximo apogeo de la técnica se produjo 20 años más tarde, cuando Hewlett-Packard introdujo la instrumentación de SFC para columnas de relleno en una Conferencia de Pittsburg en 1981.

En la cromatografía con fluidos supercríticos, la retención de los solutos está condicionada por las variables que se han comentado en apartados anteriores, la presión, la temperatura, la capacidad de solvatación y la solubilidad del soluto en la fase móvil, que dependen a su vez de la densidad del fluido supercrítico y la presión de vapor de analito. Además, por su propia capacidad de retención en la fase estacionaria, que dependerá de la química de la fase estacionaria. Sin embargo el

comportamiento del sistema puede variar, al igual que en la extracción, en valores muy próximos al punto crítico del fluido.

Las propiedades físicas que presenta un fluido supercrítico se utilizan para optimizar las separaciones cromatográficas. La elevada difusividad de un fluido supercrítico, similar a la de un gas, se relaciona estrechamente con la eficacia de una separación. La eficacia se puede medir en función del número de platos teóricos de una columna ( $N$ ), de la altura equivalente del plato teórico ( $H$ ) y de la longitud de la columna cromatográfica ( $L$ ). A mayor número de platos, mayor  $L$  y por tanto, a menor  $H$ , mayor será la eficacia

Otra de las principales ventajas de emplear un fluido supercrítico como fase móvil es la posibilidad de poder utilizar flujos elevados de fase móvil sin perder eficacia en la separación. Las curvas de Van Deemter relacionan la altura de plato teórico (eficacia) con la velocidad del flujo de la fase móvil ( $U$ ). Si, por ejemplo, se compara la curva de Van Deemter de un compuesto (pireno) para HPLC y SFC se puede observar como SFC permite mayores velocidades sin perder eficacia, lo que supondrá además menores tiempos de retención (Figura 1.10)



**Figura 1.10.** Curva de Van Deemter del pireno.

Esto permitiría separar un mismo número de compuestos en menor tiempo utilizando las mismas características de la columna.

Si se tiene en cuenta la viscosidad de la fase móvil, la presión que se genera en un sistema cromatográfico es proporcional a ella. Si la viscosidad de un FSC es baja, la presión que se genera es pequeña y por tanto se podrán emplear columnas de mayor  $L$  y se podrían emplear también mayores flujos de fase móvil, por lo tanto se podrá mejorar también la eficacia de la separación. Los cambios de presión dentro del sistema en un líquido o un gas no afectan a la capacidad de solvatación, pero si afecta en SFC, variando la densidad del fluido supercrítico y por tanto las propiedades como eluyente de la fase móvil. Si disminuye la presión a lo largo de la columna se podrá producir una pérdida de eficacia y un ensanchamiento de los picos.

Son muchos los fluidos supercríticos que pueden usarse en SFC como fase móvil (Smith, 1999), sin embargo, el más utilizado en todos los campos es el  $\text{CO}_2$ . El principal problema que presenta el  $\text{CO}_2$  es su baja polaridad, lo que hace que muchas veces sea insuficiente para el análisis de sustancias polares. Esta limitación puede solucionarse modificando la química de las columnas empleadas como fases estacionarias o empleando modificadores para aumentar la polaridad de la fase móvil.

En SFC se utilizan principalmente dos tipos de columnas, las columnas capilares y las columnas empaquetadas. Las columnas capilares tienen las mismas características que las columnas de cromatografía de gases (GC) y son en definitiva un tubo capilar vacío en cuya pared interior se encuentra inmovilizada la fase estacionaria. Estas fases suelen ser un polímero metil-, octil-, fenil-, o cianopropil-polisiloxanos o polietilenglicoles. El tamaño de diámetro interno ( $d_c$ ) de estas columnas es de 25 a 100  $\mu\text{m}$  y su longitud entre 1 y 35 metros. Las columnas empaquetadas, muy similares a las empleadas en HPLC, se rellenan con un material granular porosos de sílice o de alúmina que puede actuar directamente como fase estacionaria o como soporte de la misma. En este caso, las columnas analíticas tienen diámetros internos ( $d_c$ ) de 1-5 mm y tamaños de partícula ( $d_p$ ) de 3 a 10  $\mu\text{m}$  y su longitud oscila entre 15 y 25 cm de largo. Existe un tercer tipo de columnas, las columnas micro rellenas, que combinan las ventajas de los dos tipos anteriores. Son columnas de diámetro inferior a 1 mm y con valores de  $d_p/d_c$  menores a 0,3.

Las columnas capilares ofrecen más ventajas que las empaquetadas en términos de eficacia, estabilidad e inercia y valores más altos de la relación de fases (cociente entre los volúmenes de fase móvil y de fase estacionaria de la columna:  $\beta = V_M/V_S$ ) lo que produce retenciones pequeñas y permeabilidades altas. Sin embargo las columnas empaquetadas tienen la relación de fases más baja, es decir, retenciones elevadas pero valores menores de permeabilidad y mayores de capacidad de carga, lo que permite aumentar la sensibilidad del método y la rapidez del análisis.

Habitualmente las columnas capilares han sido utilizadas para la separación de mezclas complejas, sin embargo tienen bastantes limitaciones. Las columnas empaquetadas se recomiendan para las separaciones de mezclas con un número limitado de compuestos, moderadamente polares, combinando diferentes tipos de rellenos de sílice y modificadores en la fase móvil.

La cromatografía supercrítica también puede realizarse en modo preparativo (PS-SFC) con la ventaja frente a la cromatografía líquida preparativa, de la fácil recuperación de los compuestos mediante una simple descompresión en la que se elimina espontáneamente la fase móvil (Coleman y col., 1999) y la rapidez de la separación (Chester y col., 2002). Para este tipo de cromatografía se utilizan las columnas empaquetadas con las mismas propiedades químicas que las columnas de escala analítica pero de mayores tamaños (Bergeret y col., 1990). La mayoría de las aplicaciones de la PS-SFC se han llevado a cabo con CO<sub>2</sub> como eluyente y con el empleo de uno o más modificadores.

Son numerosas las aplicaciones de la SFC en el campo de los alimentos, tanto a escala analítica como preparativa, como se demuestra por el creciente número de patentes sobre las aplicaciones de la SFC a escala industrial (Brunner y col., 1998; Kleimann y Finley, 1991), asegurando la consolidación de esta técnica en la moderna química verde.

Dos de los primeros estudios en este campo fueron la separación de tocoferoles de germen de trigo (Sugiyama y col., 1985) y el aislamiento de cafeína de café y té (Saito y col., 1994). También se fraccionó el aceite de la cáscara de limón en diferentes compuestos como hidrocarburos, alcoholes, aldehídos o ésteres (Yamauchi y col., 1990) y se aisló tocoferol de aceite de salvado de trigo (Yamauchi y col., 1990). Se han aislado también compuestos como la glucobrassicina de las plantas de la

familia *Brassicaceae* (Buskov y col., 2000a) o la sinalbina de la planta *Sinapis alba* L. (Buskov y col., 2000b). Bamba y Fukusaki, (2009) separó diferentes carotenoides mediante SFC y el último trabajo encontrado en la bibliografía sobre carotenoides (Abrahamsson y col., 2012) muestra hasta ocho carotenoides separados y analizados mediante SFC procedentes de una micro alga.

En el campo de los aceites y grasas, se pueden citar muchos trabajos de recuperación y fraccionamiento. La recuperación selectiva de compuestos poliméricos, triglicéridos y compuestos de bajo peso molecular del aceite de cacahuete (Sesti-Osseo y col., 2003), la purificación de esteroides libres y ésteres de fitoesterol a partir de salvado de maíz (Taylor y col., 2002), la purificación de carotenoides del aceite de palma (Yuen y col., 1996) y la producción de concentrados de los ácidos docosahexanoico (DHA) y eicosapentaenoico (EPA) procedentes de aceites trans-esterificados de atún (Alkio y col., 2000) son ejemplos de las aplicaciones de la cromatografía supercrítica. Más actuales son los trabajos de Sughiara y col., (2010) en los que se realizó un fraccionamiento de destilados de desodorización de aceite de salvado de arroz, concentrando escualeno y fitoesteroides mediante distintos disolventes combinando la extracción y la cromatografía supercrítica, y el trabajo de Francois y col., (2009) que realizaron un análisis de la composición en ácidos grasos de un aceite de pescado mediante cromatografía bidimensional, utilizando cromatografía supercrítica en la primera fase (con dos columnas de intercambio catiónico en línea), y cromatografía líquida en fase reversa, en la segunda fase.

En el campo de las vitaminas también se encuentran aplicaciones. Con SFC se obtuvo una buena resolución en la separación de vitaminas hidrosolubles con la ayuda de modificadores (Pyo, 2000) y una buena separación de tocoferoles (Vitamina E) y carotenoides (provitamina A) (Ibáñez y col., 1999; Ibáñez y col., 1998).

Referente al romero se encuentra escasa información en bibliografía de trabajos realizados con esta técnica. Únicamente se encuentran tres publicaciones realizadas tanto a escala analítica como a escala preparativa (Ramírez y col., 2004; 2006; 2007). En el primero de esos trabajos, los autores evaluaron la separación del ácido carnósico mediante SFC empleando diferentes columnas cromatográficas comerciales. En el segundo de los trabajos, se fraccionó el extracto supercrítico de

romero usando una columna LC-Diol a 13 MPa, 80 °C y 10 % de etanol como co-solvente. El extracto se separó en tres fracciones, incrementándose en la segunda la concentración de ácido carnósico. Como consecuencia, la actividad antioxidante de esa fracción se incrementó alrededor de un 20 % respecto al extracto de partida. Por último, en el tercer trabajo, emplearon una columna fabricada manualmente (5 % phenyl-, 95% methylsilicone), con la que se obtuvieron resultados similares.

La industria farmacéutica está apostando fuertemente por esta técnica para concentrar y purificar compuestos sin residuos de disolventes y sin degradación de compuestos por las temperaturas moderadas que se utilizan. Como ejemplo, la concentración de antidepresivos (Berger y col., 1994) la concentración de vasodilatadores (Bhoir y col., 1998).



## JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS



## 2. Justificación y Objetivos

El impulso de la bioalimentación es uno de los principales retos a los cuales se enfrenta actualmente la Ciencia y Tecnología de los Alimentos. El desarrollo de productos que pueden reducir el riesgo de padecer enfermedades crónicas, ha originado un gran cambio en la investigación en biomedicina, que busca comprobar científicamente el mecanismo de acción de sustancias que se presentan naturalmente en los alimentos, y que demuestran un efecto beneficioso para la salud.

Una fuente natural de estas sustancias biológicamente activas son las plantas labiadas, las cuales han sido utilizadas desde la antigüedad en medicina folclórica, y a las que actualmente se les reconoce diversas propiedades bioactivas. Especialmente, el romero (*Rosmarinus Officinalis*) ha sido objeto de múltiples aplicaciones y estudios.

Asimismo, desde hace varios años se ha desarrollado una conciencia social por el cuidado y sostenimiento del medio ambiente, por lo que la investigación en nuevas tecnologías que apunten a reducir la contaminación, así como el uso de disolventes y de energía, están en pleno desarrollo. La Tecnología de Fluidos Supercríticos para la extracción de compuestos bioactivos a partir de matrices vegetales es una alternativa a las técnicas convencionales de extracción ya que es una tecnología limpia, con mínimo consumo de disolvente, rápida y segura. Además, permite una alta selectividad del proceso, pudiéndose llevar a cabo a temperaturas moderadas y en condiciones no oxidantes, lo que supone una gran ventaja a la hora de extraer compuestos de carácter termolábil o fácilmente oxidables.

Así, la combinación del interés científico actual en el desarrollo de la bioalimentación, las numerosas propiedades bioactivas reconocidas en la planta de romero, y la tendencia actual al desarrollo de tecnologías limpias de extracción y purificación han motivado este estudio que se detalla en la presente memoria y que lleva como título "**Fraccionamiento y aplicaciones de extractos supercríticos de romero (*Rosmarinus Officinalis*)**".

Si bien la extracción y fraccionamiento de romero utilizando CO<sub>2</sub> supercrítico ha sido ampliamente estudiada y referida en la literatura, en este trabajo se presenta un estudio cinético que permitió el escalado del proceso a una planta semi-piloto con

una celda de extracción de 2 litros de capacidad. También ha sido estudiado un nuevo esquema de fraccionamiento que permite optimizar no sólo la concentración de compuestos antioxidantes, compuestos diana, en una de las fracciones recogidas, sino también el rendimiento de producción de dicha fracción. Por otro lado, el empleo de la SFC con CO<sub>2</sub> para aislar los compuestos antioxidantes del romero, ha sido poco presentado en la literatura. Por esto, en este trabajo se ha estudiado el desarrollo de un método de SFC, potencialmente escalable, para producir fracciones altamente enriquecidas en antioxidantes del romero.

En base a lo referido anteriormente, el **objetivo general** de esta tesis ha sido **obtener extractos de romero con una elevada concentración de compuestos antioxidantes, utilizando tecnologías medioambientalmente limpias y para su posterior aplicación en el campo de la alimentación y de la biomedicina.**

Partiendo de este objetivo general, se plantearon los siguientes **objetivos parciales**:

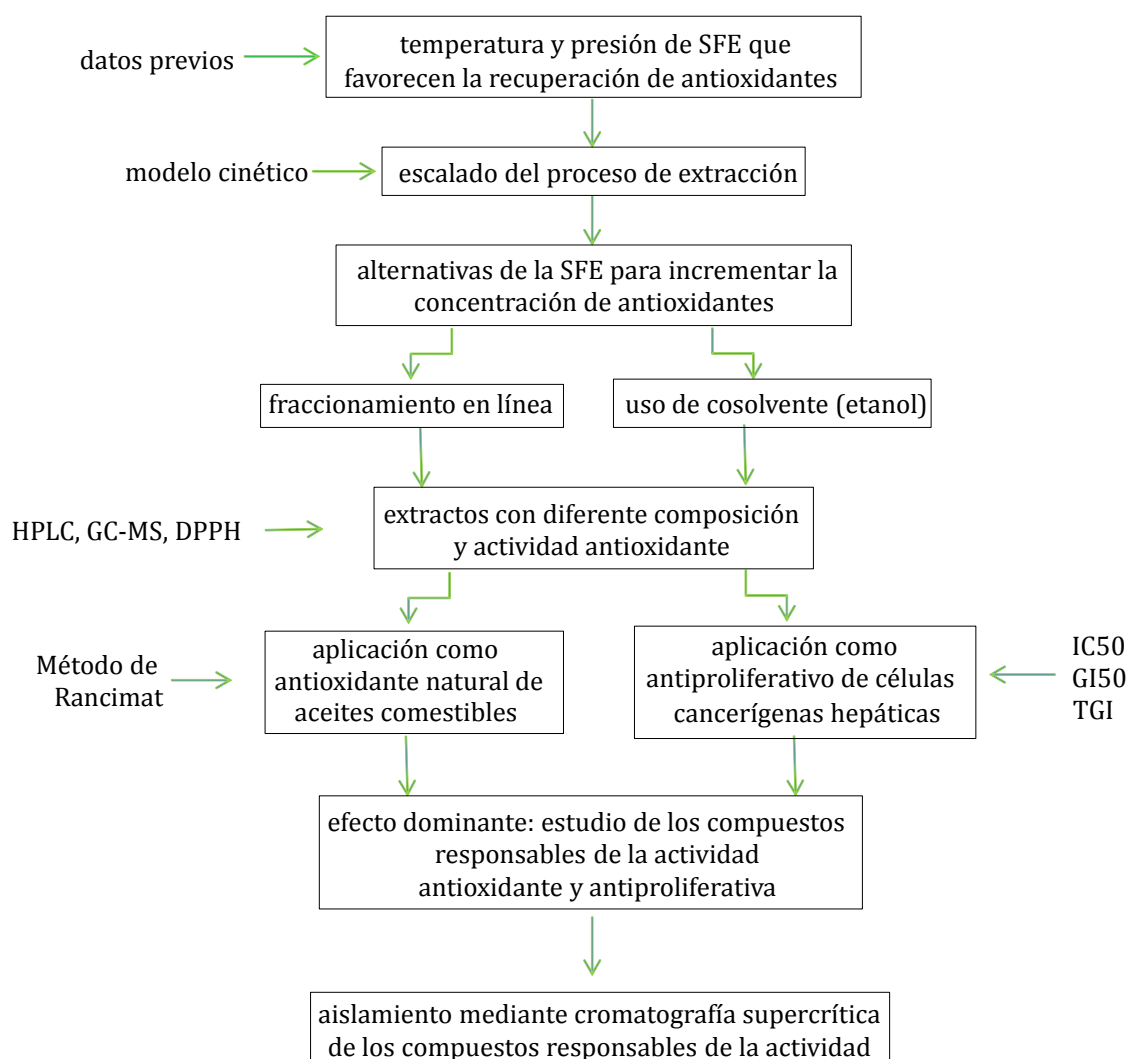
- Estudiar la cinética de extracción de hojas de romero con CO<sub>2</sub> supercrítico, con el fin de escalar el proceso de producción al equipo piloto de extracción disponible (2 litros de capacidad).
- Desarrollar un procedimiento de fraccionamiento en línea, utilizando CO<sub>2</sub> sin co-solventes, para aumentar la actividad antioxidante de una de las fracciones, manteniendo alto rendimiento de extracción, y dirigida a la producción industrial viable de extractos supercríticos antioxidantes de romero.
- Analizar el efecto de la adición de etanol como co-solvente de la extracción supercrítica de romero, determinando los cambios en el rendimiento de extracción, la composición y actividad antioxidante de los extractos.
- Estudiar la relación entre la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos y su composición, en aplicaciones alimentarias (conservante de aceites comestibles) y en biomedicina (efecto antiproliferativo de células cancerígenas hepáticas).
- Aislar el ácido carnósico, principal compuesto fenólico responsable de la actividad antioxidante de la planta, de los extractos supercríticos de romero mediante cromatografía supercrítica semi-preparativa.

# PLAN DE TRABAJO



### 3. Plan de Trabajo

Según los antecedentes expuestos y los objetivos planteados en esta tesis, se siguió el plan de trabajo que se describe a continuación, y se muestra en forma esquemática en la Figura 3.1.



**Figura 3.1:** Esquema general del plan de trabajo llevado a cabo en esta memoria.

Según plan de trabajo presentado en el esquema de la Figura 3.1 las tareas desarrolladas fueron las siguientes:

1. En base a la literatura y la experiencia previa del grupo de investigación, se establecieron las condiciones óptimas de temperatura y presión para la extracción de antioxidantes de romero utilizando CO<sub>2</sub> supercrítico (sin co-solventes).

2. Para las condiciones de temperatura y presión de extracción establecidas, se llevó a cabo el estudio cinético de la extracción y se aplicó un modelo para escalar adecuadamente el proceso. Determinación del flujo de CO<sub>2</sub> requerido para el equipo piloto disponible.

3. Ensayo de diferentes esquemas de fraccionamiento, variación del tiempo de fraccionamiento “on-line” y determinación del rendimiento, la composición y la actividad antioxidante de las fracciones obtenidas. Identificación del mejor esquema de fraccionamiento dirigido a la producción a gran escala de un extracto supercrítico de romero, con alta actividad antioxidante y sin utilizar co-solventes en el proceso de extracción.

4. Estudio de la adición de etanol como co-solvente del proceso, con objeto de incrementar la extracción de antioxidantes, combinando la extracción secuencial (en etapas) y el fraccionamiento en línea del extracto.

5. Identificación y cuantificación de los compuestos antioxidantes del romero (principalmente ácido carnósico) mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), de los compuestos principales del aceite esencial mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) y determinación de la actividad antioxidante de los extractos utilizando el método del radical libre difenil-1-picrilhidrazil (DPPH).

6. Selección de tres aceites comestibles con un alto contenido de ácidos grasos insaturados y estudio del efecto de distintos extractos supercríticos de romero, con diferente composición y actividad antioxidante. Se midió la estabilidad oxidativa de los aceites a través del método de Rancimat.

7. Determinación del efecto antiproliferativo sobre células cancerígenas hepáticas de diferentes extractos supercríticos de romero con diferente composición



y actividad antioxidante. Ensayo MTT, (Thrazolyl Blue Tetrazolium Bromide) y determinación de los valores IC<sub>50</sub>, GI<sub>50</sub> y TGI.

8. Optimización de las diferentes variables (presión, temperatura, co-solvente, química de la fase estacionaria) en la concentración y purificación de los compuestos responsables de la actividad biológica de los extractos de romero mediante cromatografía supercrítica.



# **EQUIPOS DE TECNOLOGÍA SUPERCRÍTICA**



## 4. Equipos de tecnología supercrítica

En cada uno de los artículos presentados en esta memoria se describen con claridad los materiales y métodos empleados para llevar a cabo el plan de trabajo propuesto. Sin embargo, resulta de importante hacer una descripción más detallada de los dos equipos comunes de tecnología supercrítica que han sido utilizados a lo largo de esta memoria.

Los extractos supercríticos de romero se han producido en un equipo de extracción con fluidos supercríticos a escala planta piloto modelo SF2000, de la empresa Thar Technology Pittsburgh, PA, USA (Figura 4.1).



**Figura 4.1:** Fotografía del equipo de extracción con fluidos supercríticos. (Thar SF2000).

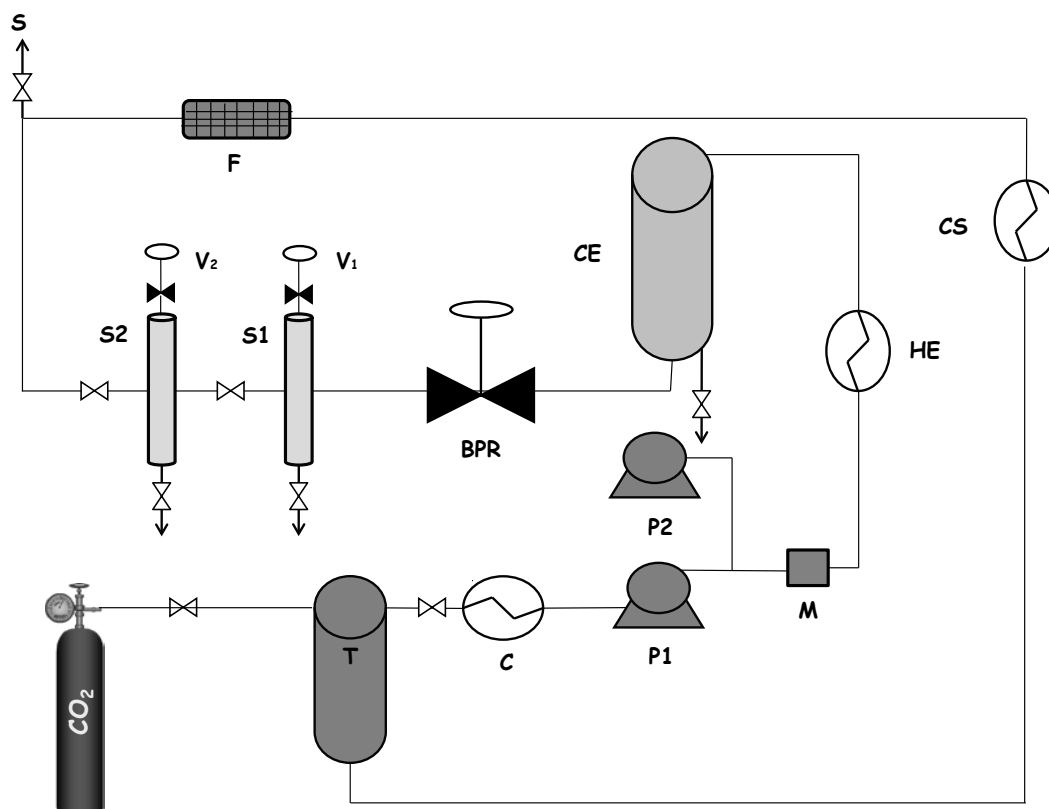
Este equipo, detallado en el esquema de la Figura 4.2, está formado por una celda de extracción cilíndrica de 2 L de capacidad (CE), (0.42 metros de altura y 0.076 metros de diámetro interno). El material que se va a extraer se introduce en la celda en el interior de una cesta de las mismas dimensiones que la celda de extracción para facilitar las operaciones de carga y descarga del material. La celda de extracción dispone de controles independientes de presión y temperatura. La planta tiene dos separadores cilíndricos (S1 y S2) para recoger el producto de la extracción, con una capacidad de 0,5 L cada uno y con control de temperatura y presión también independientes. El hecho de tener dos separadores permitirá la posibilidad de realizar una descompresión en cascada, provocando así una precipitación selectiva de los compuestos que se estén extrayendo en un separador u otro dependiendo de las condiciones que se fijen.

El equipo consta de dos bombas. La bomba principal (P1) es la encargada de bombear el CO<sub>2</sub>, y está refrigerada con un chiller (C). La temperatura del chiller está fijada en -2°C ya que la presión a la cual se obtiene el CO<sub>2</sub> se encuentra entre 5 y 6 MPa. Con esta combinación de presión y temperatura se asegura que el CO<sub>2</sub> se mantiene en estado líquido durante el bombeo. La segunda bomba (P2) del sistema permitirá la adición de un co-solvente. Existe también un mezclador (M) para asegurar un buen mezclado del CO<sub>2</sub> y el co-solvente cuando se trabaja con las dos bombas. Antes de la celda de extracción se encuentra un intercambiador de calor (HE) que permite poner al fluido en las condiciones de temperatura seleccionada (CO<sub>2</sub> o CO<sub>2</sub> + co-solvente) y asegurar su estado supercrítico. La presión se controla con una BPR (Back Pressure Regulator) que se encarga de fijar la presión del sistema de la celda de extracción. En cada separador existe una válvula manual (V<sub>1</sub> y V<sub>2</sub>) que permite fijar condiciones independientes de presión en cada separador.

Por último el equipo está dotado de un sistema de recirculación, con un tanque (T) que suministra CO<sub>2</sub> al sistema y recoge el CO<sub>2</sub> a la salida del separador 2. Para reutilizar el CO<sub>2</sub>, a la salida del separador 2 existe un filtro (F) que retiene las impurezas del fluido y un condensador (CS) que enfría el CO<sub>2</sub> para que entre de nuevo en estado líquido al tanque. También es posible trabajar sin recirculación, enviando el CO<sub>2</sub> fuera del sistema (S).

Todos los elementos descritos (a excepción de la presión en los separadores) se controlan mediante un software que permite seleccionar y ajustar los parámetros deseados.

Además, el equipo dispone de diferentes métodos de seguridad como discos de ruptura y alarmas de temperatura y presión máxima.



**Figura 4.2.** Esquema del equipo SFE utilizado

El otro equipo de tecnología supercrítica que se ha empleado en el desarrollo de esta tesis es un cromatógrafo de fluidos supercríticos. Se trata de un equipo analítico y semi-preparativo modelo Thar Investigator II, Thar Designs, USA (Figura 4.3).

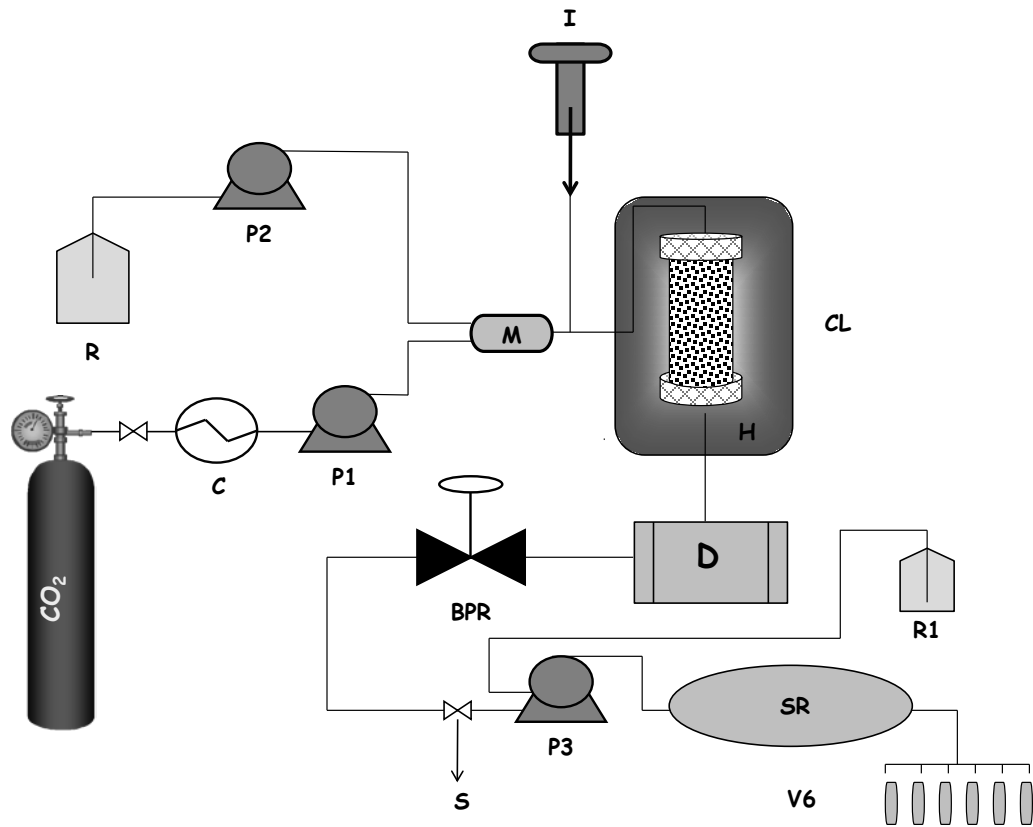


**Figura 4.3.** Fotografía del equipo SFC (*Thar Investigator II*).

El equipo, detallado en el esquema de la Figura 4.4, cuenta con dos bombas, la principal (P1) bombea el CO<sub>2</sub> y se encuentra refrigerada con un chiller (C), el cual está a -2 °C para asegurar el estado líquido del CO<sub>2</sub>. La otra bomba (P2) es la encargada de aportar hasta 6 co-solventes diferentes (R). Un mezclador (M) situado antes del inyector asegura la correcta mezcla del CO<sub>2</sub> y el co-solvente empleado. A continuación se encuentra un inyector (I), el cual permite introducir hasta 100 µl de muestra. El detector (D) es un ultravioleta visible. La columna (CL) se encuentra dentro de un horno (H) que permite mantener la temperatura deseada (hasta 60 °C) y situar la fase móvil por encima de su punto crítico. Existe la posibilidad de colocar hasta 6 columnas diferentes dentro del horno. La presión del equipo está regulada, al igual que en el equipo de extracción, una BPR situada al final del mismo. Por último el equipo tiene colector de fracciones (SR) de seis viales (V6). Este sistema de recolección está acoplado con una pequeña bomba (P3) de disolvente (R1) para asegurar la total recogida de la muestra que sale del sistema. AL final del equipo existe una salida (S) que elimina el CO<sub>2</sub> empleado en el equipo.

Todo el sistema está controlado por un software que permite fijar los parámetros deseados y cuenta con alarmas de presión y temperatura que permiten mantener la seguridad del sistema.





**Figura 4.4.** Esquema del equipo SFC utilizado.



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



## 5. Resultados y Discusión

### 5.1 Estudio de la extracción y fraccionamiento de romero mediante CO<sub>2</sub> supercrítico

#### 5.1.1 Prefacio

Una de las propiedades más importantes que presenta el romero es una gran capacidad como antioxidante. Numerosos trabajos han corroborado que los compuestos responsables de esta actividad biológica son compuestos de la familia de los diterpenos fenólicos, y el compuesto identificado como principal es el ácido carnósico. Como se ha puesto de manifiesto en la introducción de esta memoria, la SFE es una técnica capaz de producir extractos de elevadas concentraciones de estos compuestos en función de las condiciones de extracción utilizadas. Del mismo modo, la solubilidad del analito en CO<sub>2</sub> es un parámetro clave a la hora de extraer el compuesto de la matriz por lo que obviamente cuanto mayor sea este parámetro mayor será la cantidad del compuesto que se pueda extraer. En general, los compuestos antioxidantes del romero presentan una baja solubilidad en CO<sub>2</sub>. Chafer y col. (2005) midieron la solubilidad de ácido carnósico en CO<sub>2</sub> supercrítico a temperaturas entre 313 y 333 K, presiones de hasta 40 MPa y utilizando entre 0.7 y 10 % de etanol como co-solvente, obteniendo solubilidades menores que 0.045 % en peso en todas las condiciones experimentadas. Estos resultados indican que el incremento de la solubilidad del compuesto en CO<sub>2</sub> y, por lo tanto, una mayor extracción del mismo, únicamente se podría obtener si se emplean co-solventes polares en el proceso de extracción o se utilizan altas densidades del fluido supercrítico. Esto lo demuestra los resultados obtenidos por Carvalho y col, (2005) en los que utilizando presiones de 30 MPa y temperaturas moderadas, 40 °C, con una densidad del CO<sub>2</sub> es 910,8 kg/m<sup>3</sup>, se obtuvieron rendimientos de extracción en torno al 5 % y actividades antioxidantes de los extractos elevadas, señal de que se había extraído mayor cantidad de ácido carnósico.

Por lo tanto, se fijaron las condiciones de 30 MPa y 40 °C para llevar a cabo el estudio de escalado que se presentan en el artículo titulado "*Kinetic study of pilot-scale supercritical CO<sub>2</sub> extraction of Rosemary (Rosmarinus Officinalis) Leaves*".

Una vez fijadas las condiciones de temperatura y presión, se llevó a cabo el escalado del proceso en una celda de extracción de 2 litros que permite procesar hasta 500 - 600 g de romero; los resultados que se habían encontrado en la literatura se llevaron a cabo con cantidades siempre inferiores a 30 g de romero. Se estudió la cinética de extracción en estas condiciones de presión (30 MPa) y temperatura (40 °C) en el equipo piloto (Figura 4.1) y se determinaron diferentes parámetros para optimizar el proceso de extracción, tales como la variación del rendimiento con el tiempo de extracción, la concentración de ácido carnósico y la actividad antioxidante del extracto.

En el escalado del proceso a una celda de extracción de tamaño superior fue necesario el cálculo del flujo de CO<sub>2</sub>, para mantener la misma cinética de extracción que la presentada en la literatura a escala analítica. Este cálculo se realizó en base a una correlación presentada por Carvalho y col., (2005). El flujo de CO<sub>2</sub> resultante y las mismas condiciones de presión y temperatura se aplicaron a dos ensayos diferentes. El primero de ellos (E1) se llevó a cabo sin realizar fraccionamiento del extracto, todo el producto de la extracción se recogió en el mismo separador (S1) a intervalos de 2 horas durante un tiempo total de extracción de 8 horas. En el segundo ensayo (E2) se llevó a cabo el fraccionamiento del material extraído, manteniendo el S1 a 10 MPa y S2, a presión ambiente. En este ensayo las muestras fueron recogidas en cada separador a intervalos de 1,5 horas y el tiempo total de la extracción fue de 4,5 horas.

El rendimiento global de extracción de ambos ensayos se representó utilizando el modelo de Sovová (1994), determinando los coeficientes de transferencia de materia en la fase supercrítica (disolvente) y en la fase sólida (materia prima) y comparando los valores obtenidos con datos de la literatura. Para las dos extracciones realizadas el rendimiento global de extracción fue similar al obtenido a escala analítica, aunque la cinética de extracción a escala piloto fue relativamente más lenta. Es decir, la velocidad de extracción observada en la celda de 2 litros resultó algo menor que la observada a escala analítica. Este resultado se atribuyó al mayor tamaño de partículas empleado en los ensayos a escala piloto, tal como lo corroboran los bajos coeficientes de transferencia de materia obtenidos para la difusión de analitos en la fase sólida.

El análisis de las fracciones recogidas demostró un aumento significativo con el tiempo de extracción, tanto de la concentración de ácido carnósico como de la actividad antioxidante del extracto. La comparación de los dos ensayos llevados a cabo permitió observar que se produjo una concentración selectiva de ácido carnósico en el primer separador (tal como está descrito en la literatura). Los resultados también mostraron que los componentes del aceite esencial son extraídos casi completamente de la matriz vegetal en las primeras horas de extracción mientras que la concentración de ácido carnósico en los extractos sigue una tendencia lineal durante todo el tiempo estudiado (hasta 8 h). Es decir, después de eliminar el aceite esencial de la matriz vegetal, no sólo las fracciones recogidas en S1, sino también las fracciones recogidas en S2 presentan un contenido importante de ácido carnósico.

Esta observación motivó el estudio de fraccionamiento que se presenta en el trabajo titulado *"Supercritical fractionation of Rosemary extracts to improve the antioxidant activity"*.

En este segundo trabajo se plantea un esquema de fraccionamiento novedoso con el objetivo de obtener una fracción rica en antioxidantes (respecto de una extracción sin fraccionar) pero intentando mantener un alto rendimiento de extracción. Este objetivo sería de gran importancia en la producción a gran escala, mediante tecnología de CO<sub>2</sub> supercrítico sin co-solvente, de un extracto antioxidante de romero comercialmente atractivo.

Las condiciones de temperatura y presión de extracción se mantuvieron constantes respecto al trabajo anterior (30 MPa y 40 °C) pero, en base a los resultados obtenidos, el tamaño de partícula de las hojas de romero se redujo (entre 200 y 500 µm) y el flujo de CO<sub>2</sub> se incrementó de 2,4 a 3,6 kg/h con el objetivo de aumentar la velocidad de extracción. El tiempo total de extracción se fijó en 5 horas, ya que era tiempo suficiente para la eliminación del aceite esencial de la matriz vegetal.

Los resultados de los diferentes estudios demuestran que la composición del producto extraído varía en función del tiempo de extracción. Así, la concentración en el extracto de compuestos más volátiles y solubles en CO<sub>2</sub> (terpenos y terpenos oxigenados) disminuye a medida que aumenta el tiempo de extracción, mientras que la extracción de los compuestos de mayor peso molecular y/o sustancias polares

(diterpenos, sesquiterpenos, compuestos fenólicos) aumenta a medida que avanza la extracción. Por lo tanto, el esquema de fraccionamiento en línea de los extractos de romero, también debe variar en el tiempo con el fin de producir una separación selectiva de las sustancias antioxidantes y para maximizar su rendimiento y concentración.

Con este objetivo, se estudió un procedimiento de extracción de un tiempo total de 5 horas con fraccionamiento en dos periodos diferentes denominados EP de distintas horas de duración. Durante el primer periodo (EP1) la presión en el primer separador (S1) se fijó en 10 MPa, mientras que la presión en el segundo separador (S2) se mantuvo a la presión del sistema de recirculación (5 MPa). Es decir, durante el tiempo que dura el EP1 se realiza el fraccionamiento en línea del material extraído. En el segundo periodo de extracción ( $EP2 = 5 - EP1$ ) los dos separadores se mantienen a la presión del sistema de recirculación, por lo tanto, no se produce fraccionamiento del extracto y todo el material extraído en este periodo se recogerá en S1, mezclándose con el material precipitado durante el periodo EP1. La duración del primer periodo (EP1) se varió en los diferentes ensayos de extracción, aumentando de 1 a 5 horas, con el fin de determinar el tiempo óptimo necesario para eliminar de la matriz vegetal la mayor parte de los componentes del aceite esencial, y así obtener en S1 un producto con alto rendimiento y concentración de antioxidantes. Los resultados obtenidos permitieron la producción de un extracto antioxidante de romero con un 17 % en peso de ácido carnósico y un rendimiento de extracción cercano al 3 %. Esta concentración de ácido carnósico representa casi el doble de la que se obtuvo sin fraccionar, y el rendimiento de extracción es 4,7 veces mayor que el que se obtuvo manteniendo las condiciones de fraccionamiento durante toda la extracción.

En resumen, los dos trabajos presentados en esta sección permitieron por un lado, determinar las condiciones cinéticas de extracción supercrítica de romero en una celda de escala piloto, reproduciendo los mejores resultados analíticos observados en la literatura y, por otro lado, desarrollar un esquema de fraccionamiento novedoso que permitió optimizar la producción de un extracto de romero, con buena capacidad antioxidante, alto rendimiento, y utilizando CO<sub>2</sub> supercrítico sin co-solventes.



### 5.1.2 Kinetic study of pilot-scale supercritical CO<sub>2</sub> extraction of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) leaves

Mónica R. García-Risco, Elvis J. Hernández, **Gonzalo Vicente**, Tiziana Fornari, Francisco J. Señoráns and Guillermo Reglero.

*Journal of supercritical fluids* 55 (2011) 971–976

#### Abstract

*Rosmarinus officinalis* (rosemary) extracts were obtained in a supercritical pilot-scale plant. Based on experimental information available in the literature for analytical or low-scale processes, extraction temperature and pressure were selected to be 313 K and 30 MPa. At these extraction conditions, the kinetic behavior of the pilot-scale overall extraction curve were determined with respect to yield, antioxidant activity and carnosic acid content. The overall extraction curve was represented using Sovova's model; the average deviation between measured and calculated yields was lower than 2%. Mass transfer coefficients in the fluid and solid phases were determined and were compared with previous data reported in the literature for low-scale rosemary supercritical extraction.

A two-stage depressurization procedure was accomplished and the effect of both on-line fractionation and extraction time on the antioxidant activity of the samples collected was studied. The antioxidant activity of the different fractions could be straight correlated with the carnosic acid content with a regression coefficient of 0.92.

## 1. Introduction

The use of supercritical carbon dioxide (SCCO<sub>2</sub>) to obtain extracts from plants is an attractive separation technique for the recovery of valued food ingredients (Pourmortazavi y col., 2007; Reverchon y De Marco., 2006; Babovic y col., 2007; Herrero y col., 2010). Particularly, the extraction of antioxidants from vegetable sources using organic solvents has the disadvantage of oxidative transformation during solvent removal (Sebastian y col., 1998); it has been reported (Schwarz y col., 1992) that supercritical fluid extraction (SFE) can produce extracts with better antioxidant activity than those obtained using organic solvents.

Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) has been recognized as one of the plants with large antioxidant activity. Main substances associated with the antioxidant activity are the phenolic diterpenes such as carnosol, rosmanol, carnosic acid, methyl carnosate, and phenolic acids such as the rosmarinic and caffeic acids (Ibañez y col., 2003; Terpnik y col., 2009). The extraction of rosemary leaves using supercritical CO<sub>2</sub> has been intensely investigated (Herrero y col., 2010; Chang y col., 2008; Carvalho y col., 2005; Reverchon y Sanatore; 1992; Bensebia y col., 2009; Yesil-Celkitas y col., 2007; Ibañez y col., 1999; Cavero y col., 2005).

Extraction temperature, pressure, type and amount of modifier determine the solubility of these substances in the supercritical solvent and thus have a direct effect on the extract composition and on the functional properties of the extract. Several authors (Ibañez y col., 2003; Carvalho y col., 2005; Reverchon y Sanatore., 1992) have compared supercritical rosemary extracts with the extracts obtained using liquid solvents (ethanol and hexane) and hydrodistillation, concluding the superior antioxidant activity of SFE extracts.

Additionally, other factors such as plant origin and pre-treatment have an important effect on the composition of rosemary extracts (Szumny y col., 2010; Napoli y col., 2010; Zaouali y col., 2010).

Celiktas et al. (2007) demonstrated that even applying the same process conditions, extracts obtained from leaves collected in different locations and harvesting time have rather different composition: for the different sources of rosemary leaves extracted in their work (at 35 MPa, 100°C and with 5% of methanol

as co-solvent), the carnosic acid content in the extracts obtained varied from 0.5 to 11.6 % wt.

Carvalho et al. (2005) studied rosemary SFE using pure carbon dioxide in low-scale extraction cells (up to 0.1 kg of vegetal material) of different size; different extraction conditions were studied, but no fractionation of the extract was accomplished. SFE extracts at 30 MPa and 313 K resulted to be the ones with the highest concentration of carnosic acid (up to 21.5 %wt) with an overall extraction yield around 5.0%. As well, Bensebia et al. (2009) present a study about the effect of several process parameters (solvent flow rate, extraction pressure and temperature, fractionation of the extract) on the SFE of rosemary leaves (0.01 kg) and calculated the corresponding mass transfer coefficients on the basis of Sovova model (1994).

Fractionation of the extract was first reported by Ibáñez et al. (1999): two successive extraction steps resulted in a low-antioxidant fraction in the first step (10 MPa and 313 K) and a high-antioxidant fraction in the second step (40 MPa and 333 K). In the same way, on-line fractionation of the extract in a depressurization system (comprised of two separators) to produce a selective separation of the antioxidant substances has been studied by these authors Cavero y col., 2005); they confirmed a direct relationship between the carnosic acid content and the antioxidant activity of the 16 samples collected employing different extraction and fractionation conditions.

Besides the effect of the extraction conditions and separation schemes mentioned before it has to be considered that the composition of the extract varies during the extraction time. Reverchon et al. (1995) reported that extraction time proved to be one of the main parameters that determine the composition of the fraction extracted. Decreasing percentages of lighter compounds (terpenes and oxygenated terpenes) were found as extraction time increase, while higher-molecular-weight compounds (sesquiterpenes and oxygenated sesquiterpenes) showed a continuous percentage increase at increasing extraction times.

The works reported by Bensebia et al. (2009), Carvalho et al. (2005), Reverchon and Sanatore (1992), Celiktas et al. (2007), Ibáñez et al. (1995) and Cavero et al. (2005) are some examples of the abundant studies reported in the literature about rosemary SCCO<sub>2</sub> extraction. All these works were carried out over analytical (less than 1-4 grams of sample) or low-scale apparatus (30-100 grams of

sample). In this work a kinetic study of rosemary SFE was carried out using a pilot-scale extraction cell of 2 L capacity and processing 0.6 kg of rosemary sample. This study is our first step towards the large-scale SFE extraction of rosemary leaves.

Pure SCCO<sub>2</sub> was used bearing in mind the economic advantage that signifies avoiding the use of cosolvents from an industrial point of view. The extractions were carried out at 30 MPa and 313 K, taking into consideration the high yields and carnosic acid content reported by Carvalho et al. (2005) at these conditions and when no modifier is employed. On-line fractionation was accomplished using a depressurization system comprised of two separator vessels; fractions were collected at different intervals of time in each of the two separators. The kinetic behavior of the different samples extracted was studied with respect to yield, antioxidant activity and carnosic acid content.

## **2. Materials and methods**

### **2.1 Chemicals**

2, 2- Diphenil-1-ptycril hydrazyl hydrate (DPPH, 95% purity) were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain) and carnosic acid ( $\geq 96\%$ ) and carnosol ( $\geq 96\%$ ) were purchased from Alexis Biochemical (Madrid, Spain). Ethanol, acetonitrile and phosphoric acid were all HPLC grade from Lab Scan (Dublin, Ireland).

### **2.2 Rosemary leaves preparation**

The rosemary sample (*Rosmarinus officinalis* L.) consisted of dried rosemary leaves obtained from an herbalist's producer (Murcia, Spain). Rosemary leaves were collected during September and dried using a traditional method previously described Ibañez y col., 1999). A kitchen-type knife mill was employed to carry out grinding of the rosemary leaves. The mill was adapted so as to break up the row material under cryogenic conditions (using carbon dioxide). The particle size distribution was determined with a vibratory sieve shaker. Sieves were selected in order to have high yield in the grinding process ( $>85\%$ ). Particle size obtained was in the range of 500 to 1000  $\mu\text{m}$ . The whole sample was stored at  $-20^\circ\text{C}$  until use.

### 2.3 Supercritical extraction method

Extractions were carried out in a pilot-plant-scale supercritical fluid extractor (Thar Technology, Pittsburgh, PA, USA, model SF2000) comprising a 2 L cylinder extraction cell and two different separators (S1 and S2), each of 0.5 L capacity, with independent control of temperature and pressure. The extraction vessel has a height/diameter ratio of 5.5 (0.42 m height, 0.076 m internal diameter). For each experiment, the cell was filled with 0.6 kg of rosemary.

Two extractions (E1 and E2) were performed at 313 K and 30 MPa. Separators S1 and S2 were maintained at 313 K and CO<sub>2</sub> flow rate was set to 2.4 kg/h in both experiments. E1 extraction was carried out with no fractionation of the extract (depressurization up to ambient pressure was accomplished in S1) and samples were collected at intervals of 2 h for a total extraction time of 8 h. During E2 extraction, fractionation of the extract was obtained by maintaining S1 at 10 MPa while complete depressurization was completed in S2. In this case, samples were collected from both separators at intervals of 1.5 h during 4.5 h.

The solid fractions obtained in S1 and S2 were collected and placed in vials. In order to ensure an accurate determination of extraction yield with time, separators were washed with ethanol and the residual material recovered in each case was mixed with the corresponding solid fraction. Ethanol was eliminated by evaporation and then, homogeneous solid samples were obtained and kept under N<sub>2</sub>, at -20°C in the dark until analysis.

### 2.4 HPLC analysis

The analysis of the samples was carried out in an HPLC (Varian Pro-star) equipped with a Nova Pack C<sub>18</sub> column (Waters) of 15 mm × 4.6 mm and 3.5 µm particle size. The mobile phase consisted of acetonitrile (solvent A) and 0.1% of phosphoric acid in water (solvent B) applying the following gradient: 0–8 min, 23% A and 8–20 min, 75% A. This last composition was kept until the end of the chromatogram and initial conditions were gained in 5 min. Total time analysis was 40 minutes. The flow rate was constant at 0.7 mL/min. Injection volume was 20 µL and the detection was accomplished by using a diode array detection system Varian

storing the signal at a wavelength of 230, 280 and 350 nm. The analysis is based on Almela et al. (2006).

## 2.5 Antioxidant activity by the DPPH test

The effect of each extract on DPPH radical was estimated according to the procedure described by Brand-Williams et al. (1995). An aliquot (50  $\mu$ l) of ethanol solution prepared from the extract concentrations (from 20 to 1  $\mu$ g/ml) was added to 1.950  $\mu$ l of DPPH in ethanol (23.5  $\mu$ g/L) prepared daily. Reaction was completed after 3 h at room temperature and absorbance was measured at 516 nm in a Shimadzu UV-120-01 spectrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan). The DPPH concentration in the reaction medium was calculated from a calibration curve determined by linear regression ( $y = 0.0247x - 0.0029$ ,  $R^2 = 0.9999$ ). Ethanol was used to adjust zero and DPPH-ethanol solution as a reference sample.

This method consists in the neutralization of free radicals of DPPH by the antioxidant extracts. The percentage of remaining DPPH against the extract concentration was then plotted to obtain the amount of antioxidant necessary to decrease the initial DPPH concentration by 50% or  $EC_{50}$ . The lower the  $EC_{50}$ , the higher the antioxidant power.

## 3. Mathematical modeling

The mathematical model of Sovová (1994) was applied to represent the experimental overall extraction curve (OEC) obtained in the pilot-scale SFE of rosemary leaves.

The model is based on the assumption that  $X_p$  of solute is easily accessible to the solvent (due to cell wall disruption) while the rest ( $X_k$ ) remains inside cell walls. Thus, the SFE process is divided in three steps:

- The constant extraction rate period, where only the easily accessible solute is removed and thus, is controlled by convection in the fluid phase;
- The falling extraction rate period, where both convection and diffusion are important;
- And the diffusion controlled extraction rate period, where the remaining solute is only inside the cell walls.

**Table 1.** Mass extracted,  $E_{C50}$  value and carnosic acid content of the different samples collected in extraction E1.

time (h)	mass extracted (g)	accumulated yield <sup>a</sup>	$E_{C50}$ ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	carnosic acid content (%wt)
2	16.14	2.69	21.8	7.8
4	5.24	3.56	9.9	14.7
6	4.72	4.35	7.2	18.0
8	2.40	4.75	6.0	28.0

<sup>a</sup> overall mass extracted / mass load x 100

Additionally, it is considered that the supercritical solvent flows axially through a cylindrical extraction bed, the solvent is solute-free at the bed inlet and particle size distribution is homogeneous throughout the extraction cell.

Based on these assumptions Sovová (1994) solved the mass balance equations for both fluid and solid phases, leading to the following equations to calculate the mass extracted ( $m$ ) as a function of extraction time ( $t$ ):

$$\text{Constant extraction rate period: } m = Q Y^* [1 - \exp(-Z)] t \quad (1)$$

$$\text{Falling extraction rate period: } m = Q Y^* [t - t_{CER} \exp(Z_w - Z)] \quad (2)$$

Diffusion controlled extraction rate period:

$$m = m_{SI} \left\{ X_o - \frac{Y^*}{W} \ln \left[ 1 + \left[ \exp \left( \frac{WX_o}{Y^*} \right) - 1 \right] \exp \left[ \frac{WQ(t_{CER} - t)}{m_{SI}} \right] \left( \frac{X_k}{X_o} \right) \right] \right\} \quad (3)$$

Where:

$$Z = \frac{m_{SI} k_{YA} \rho}{Q (1 - \varepsilon) \rho_s} \quad (4)$$

$$W = \frac{m_{SI} k_{XA}}{Q (1 - \varepsilon)} \quad (5)$$

$$Z_w = \frac{ZY^*}{WX_o} \ln \left\{ \frac{X_o \exp[WQ(t - t_{CER})/m_{SI}] - X_k}{X_o - X_k} \right\} \quad (6)$$

$$t_{CER} = \frac{m_{SI}(X_o - X_k)}{Y^* ZQ} \quad (7)$$

$$m_{SI} = X_o F \quad (8)$$

Process parameters needed to apply the model are: bed porosity ( $\varepsilon$ ), CO<sub>2</sub> mass flow rate ( $Q$ ), mass of feed ( $F$ ) and solid density ( $\rho_s$ ). Additionally, extraction temperature and pressure define CO<sub>2</sub> density ( $\rho$ ), solubility of the extract in the extraction solvent ( $Y^*$ ) and global extraction yield ( $X_o$ ).

Extraction yield is calculated as the ratio between the mass extracted ( $m$ ) and the mass of raw material employed ( $F$ ). Model parameters which are optimized according to the experimental OEC are the intra-particle solute ratio ( $X_k$ ) and the fluid phase and solid phase mass transfer coefficients ( $k_{YA}$  and  $k_{XA}$ ).

#### 4. Results and discussion

Considering the extractor volume (2 liters) and the mass of rosemary leaves load (0.6 kg) the apparent bed density is  $\rho_{app} = 300 \text{ kg/m}^3$ .

As mentioned before, extractions were carried out at 30 MPa and 313 K, since high extraction yields are reported in the literature at these process conditions and when no modifier is employed. The CO<sub>2</sub> flow ( $Q$ ) was selected according to the correlation proposed by Carvalho et al. (2005) to maintain the same kinetic behavior in two different SFE units:

$$\frac{Q_2}{Q_1} = \left( \frac{F_2}{F_1} \right)^2 \times \frac{H_1}{H_2} \times \left( \frac{D_1}{D_2} \right)^3 \quad (9)$$

where  $H$  and  $D$  are, respectively, the extraction cell height and diameter and  $F$  is the mass of vegetal material placed into the extraction cell.

Carvalho et al. (2005) reported high extraction yield (ca. 4.0%) in the SCCO<sub>2</sub> extraction of 0.0307 kg ( $F_1$ ) of rosemary leaves after 4 hours of extraction at 30 MPa and 313 K, and using: (a) 2.8 H/D extraction cell ( $H_1=0.095\text{m}$ ;  $D_1=0.0339\text{m}$ ) and  $Q_1 = 0.3 \text{ kg/h}$ ; (b) 0.67 H/D extraction cell ( $H_1=0.0367\text{m}$ ;  $d_1=0.0548\text{m}$ ) and  $Q_1 = 0.189 \text{ kg/h}$ . In both cases, and considering the dimensions of the extraction cell employed in this work ( $H_2=0.42\text{m}$ ;  $D_2=0.076\text{m}$ ) and the mass of rosemary placed into the extraction cell ( $F_2 = 0.6 \text{ kg}$ ), the CO<sub>2</sub> flow resulted from Eq. (9) is  $Q_2 \approx 2.4 \text{ kg/h}$ . This CO<sub>2</sub> flow should provide for our large-scale SFE unit a kinetic behavior similar to that observed for Carvalho et al. (2005) in the low-scale SFE units.



**Table 2.** Mass extracted,  $E_{C50}$  value and carnosic acid content of the different samples collected in S1 and S2 separators of extraction E2.

time (h)	mass extracted (g)		accumulated yield <sup>a</sup>	$E_{C50}$ ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )		carnosic acid content (%wt)	
	S1	S2	S1+ S2	S1	S2	S1	S2
1.5	6.29	5.60	1.98	22.3	39.8	12.0	1.8
3.0	3.00	3.75	3.11	14.2	22.1	15.5	7.5
4.5	2.22	2.14	3.83	12.6	18.0	19.0	12.3

<sup>a</sup> overall mass extracted / mass load x 100

Tables 1 and 2 report the mass collected, respectively, in extractions E1 and E2. Also given in the corresponding tables are the  $EC_{50}$  values and the carnosic acid content of the different fractions obtained in the separators at the different intervals of time.

The OEC obtained by merging the results obtained for E1 and E2 assays are shown in Figure 1, together with some of the data reported by Carvalho et al. (2005). As can be observed in the figure the kinetic behavior of the low-scale SFE units with 0.67 and 2.8 H/D ratios is reasonably reproduced in our pilot-scale extraction experiment, although is somewhat delayed. On possible reason of this retarded kinetic behavior could be the larger particle size employed in our assays (500-1000  $\mu\text{m}$ ) in comparison to the particle size utilized by Carvalho et al. (2005) (660  $\mu\text{m}$ ).

#### 4.1 Mathematical modeling of the large-scale OEC

The model of Sovová (1994) was applied to reproduce that large-scale OEC and estimate the corresponding mass transfer coefficients. Table 3 shows all model parameters employed.

The solubility of the extract in  $\text{SCCO}_2$  ( $Y^*$ ) at 30 MPa and 313 K was estimated as the slope of the first part of the extraction curve. Global yield ( $X_o$ ) was fixed as the asymptotic value for large extraction times ( $t \rightarrow \infty$ ).  $X_o$  together with the mass transfer coefficients ( $k_{YA}$  and  $k_{XA}$ ) and the intra-particle solute ratio ( $X_k$ ) were simultaneously

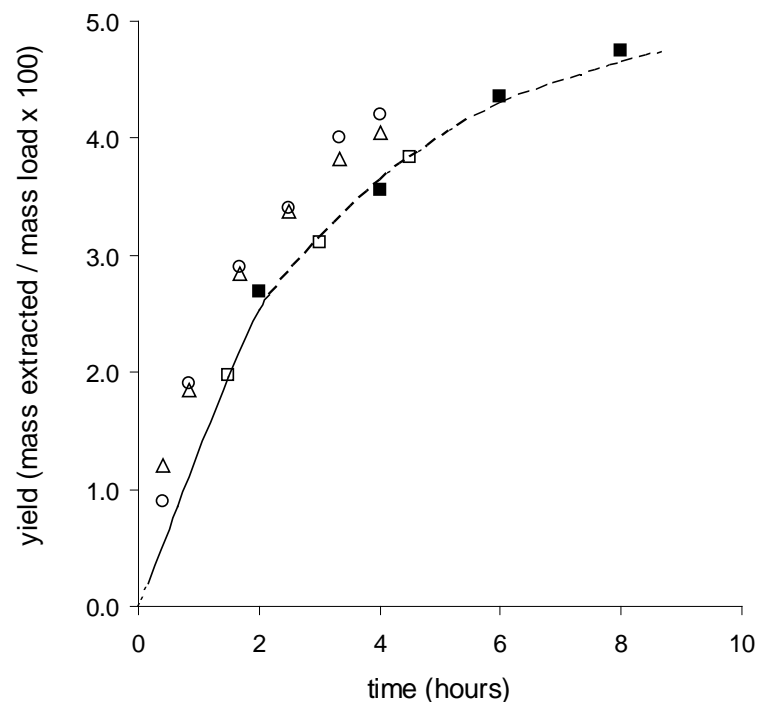
optimized in order to minimize the absolute average deviation (*AAD*) between the experimental and calculate yield:

$$AAD\% = \frac{100}{N} \times \sum \left| \frac{y^{\text{exp}} - y^{\text{cal}}}{y^{\text{exp}}} \right| \quad (10)$$

The optimal parameters obtained are given in Table 3 and the *AAD*% resulted to be 1.96%. Also given in Table 3 are some significant parameters, such as the constant extraction rate period ( $t_{\text{CER}}$ ) and the falling extraction rate period. The OEC obtained is depicted in Figure 1, indicating the three different extraction rate periods. As can be observed in Table 3, the resulted value for  $X_o$  is 0.053, which is in accordance with the 5% of global extraction yield reported by Carvalho et al., (2005) at 30 MPa and 313 K. Additionally, the extract solubility estimated in this work ( $Y^* = 0.00330$  kg/kg) is very similar to the value calculated by Carvalho et al. (0.00335 kg/kg).

**Table 3.** Process and model parameters obtained for the pilot-scale SFE of rosemary leaves at 30 MPa and 313 K.

Process parameters:	
CO <sub>2</sub> density, $\rho$ (kg/m <sup>3</sup> )	910.8
Solid particle density, $\rho_s$ (kg/m <sup>3</sup> )	1046.0
Bed porosity, $\varepsilon$	0.71
Extractor height, $H$ (m)	0.42
Extractor diameter, $D$ (m)	0.076
Rosemary leaves load, $F$ (kg)	0.60
CO <sub>2</sub> flow, $Q_{\text{CO}_2}$ (kg/s)	$6.7 \cdot 10^{-4}$
Sovova's model parameters:	
Extract solubility, $Y^*$ (kg/kg)	0.00330
Global yield, $X_o$ (kg/kg)	0.053
Intra-particle solute ratio, $X_k$ (kg/kg)	0.034
Mass transfer coefficient in the fluid phase, $k_{YA}$ (s <sup>-1</sup> )	$3.5 \cdot 10^{-3}$
Mass transfer coefficient in the solid phase, $k_{XA}$ (s <sup>-1</sup> )	$3.0 \cdot 10^{-5}$
Constant extraction rate period, $t_{\text{CER}}$ (s)	547.4
Falling extraction rate period (s)	7796.8



**Figure 1.** Rosemary extract yield as a function of extraction time obtained at 30 MPa and 313 K. Pilot-scale SFE unit  $H/D = 5.5$  (this work): (■) E1 and (□) E2. Low-scale SFE units [4]: (○)  $H/D = 2.8$  and (△)  $H/D = 0.67$ . Lines represent the mathematical model: (····) constant extraction rate period; (—) falling extraction rate period; (— —) diffusion controlled extraction rate period.

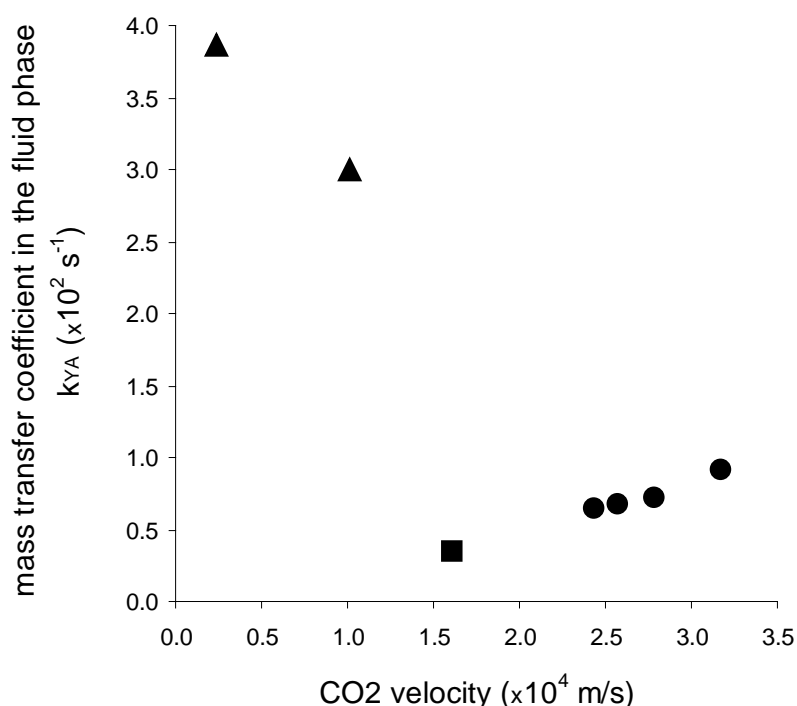
**Table 4.** Mass transfer coefficients obtained using Sovova's model in low-scale rosemary SCCO<sub>2</sub> extraction ;and in the pilot-scale OEC measured in this work. For all experiments the extraction temperature was 313 K.

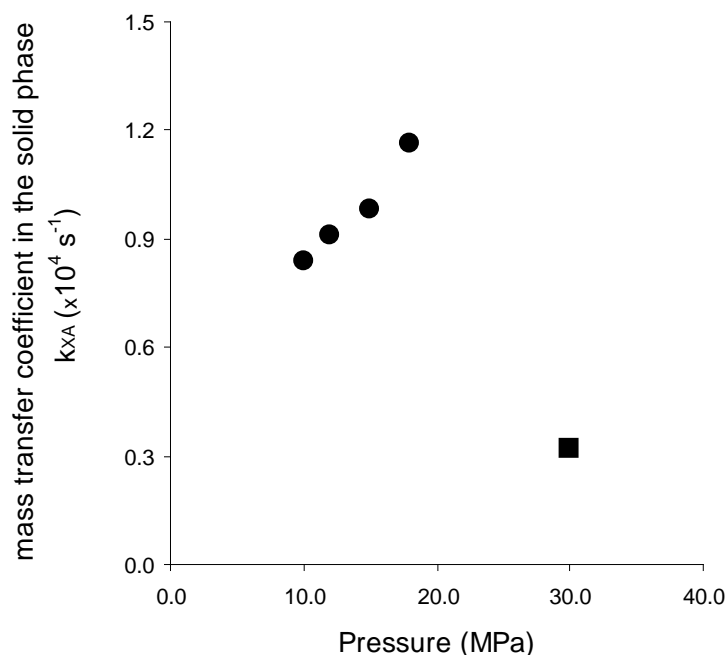
P (MPa)	D (m)	particle size (μm)	F (kg)	Q <sub>CO2</sub> 10 <sup>5</sup> (kg/s)	CO <sub>2</sub> density ρ (kg/m <sup>3</sup> )	CO <sub>2</sub> velocity <sup>a</sup> 10 <sup>4</sup> (m/s)	X <sub>k</sub> (kg/kg)	k <sub>YA</sub> 10 <sup>2</sup> (s <sup>-1</sup> )	k <sub>XA</sub> 10 <sup>4</sup> (s <sup>-1</sup> )	t <sub>CER</sub> (s)	Reference
10	0.0230	436.4	0.010	8.33	629.9	3.18	0.009	0.91	0.84	4012.9	Schwarz y col., 1992
12	0.0230	436.4	0.010	8.33	718.4	2.79	0.011	0.71	0.91	3681.9	Schwarz y col., 1992
15	0.0230	436.4	0.010	8.33	780.9	2.57	0.017	0.67	0.98	3232.9	Schwarz y col., 1992
18	0.0230	436.4	0.010	8.33	820.3	2.44	0.019	0.64	1.17	2327.9	Schwarz y col., 1992
30	0.0548	660	0.0307	5.25	910.8	0.24	n. r.	3.90	n. r.	1815.6	Herrero y col., 2010
30	0.0339	660	0.0307	8.33	910.8	1.01	n. r.	3.00	n. r.	3127.2	Herrero y col., 2010
30	0.0760	500-1000	0.600	66.7	910.8	1.61	0.034	0.35	0.30	574.4	this work

<sup>a</sup> CO<sub>2</sub> velocity = (Q<sub>CO2</sub>/ρ)/(πD<sup>2</sup>/4)

n. r. = data no reported.

Table 4 presents a comparison between the parameters ( $X_k$ ,  $k_{YA}$  and  $k_{XA}$ ) regressed using Sovova's model in low-scale OEC (Carvalho y col., 2005; Bensebia y col., 2009) and in the pilot-scale OEC measured in this work. Figure 2 shows the variation of (a)  $k_{YA}$  with solvent velocity and (b)  $k_{XA}$  with extraction pressure. The  $k_{YA}$  value obtained in this work is quite in accordance with the values reported by Bensebia et al. (2009), asserting a  $k_{YA}$  increase with a solvent velocity increase. However, the  $k_{XA}$  value obtained is around one order of magnitude lower than those reported by Bensebia et al (2009). This low  $k_{XA}$  value is a result of the high particle size employed in our experimental assays (500-1000  $\mu\text{m}$ ). Consequently, large amounts of solute remained inside the cell walls (ca. 64% of the extractable solute, according to the  $X_k$  value) and the constant extraction rate period is quite short ( $t_{CER} = 547.4$  s). Furthermore, the falling extraction rate period is around 2 h and thus, the OEC is mainly governed by mass transfer diffusion in the solid phase.

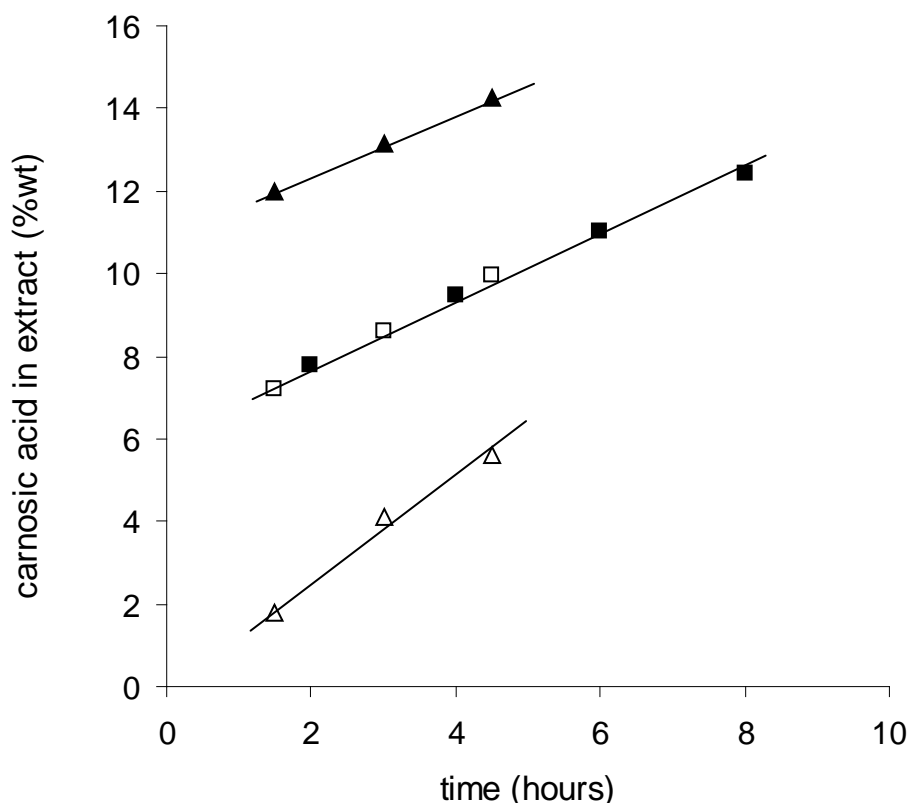




**Figure 2.** Mass transfer coefficients for the SFE of rosemary leaves at 313 K and different extraction pressures (10-30 MPa). (a)  $k_{YA}$  as a function of solvent velocity; (b)  $k_{XA}$  as a function of extraction pressure. (▲) Carvalho et al. (2005); (●) Bensebia et al. (2009); (■) this work.

#### 4.2 Analysis of carnosic acid content and antioxidant activity of extracts

Figure 3 shows the carnosic acid (CA) content (%wt) determined for all fractions collected. The amount of CA in these fractions increases linearly with increasing extraction time. As expected, the fractionation accomplished in E2 produced a selective accumulation of CA in S1 separator and thus, samples collected in S1 exhibit higher CA content than samples collected in S2. Further, the estimated slope for S2 fractions is clearly higher than those of S1 fractions and the no-fractionated samples. This effect could be explained due to a decrease of the amount extracted of the lighter compounds (terpenes and oxygenated terpenes) as extraction time increases (Reverchon y col., 1995), since these substances mainly precipitate in S2 separator



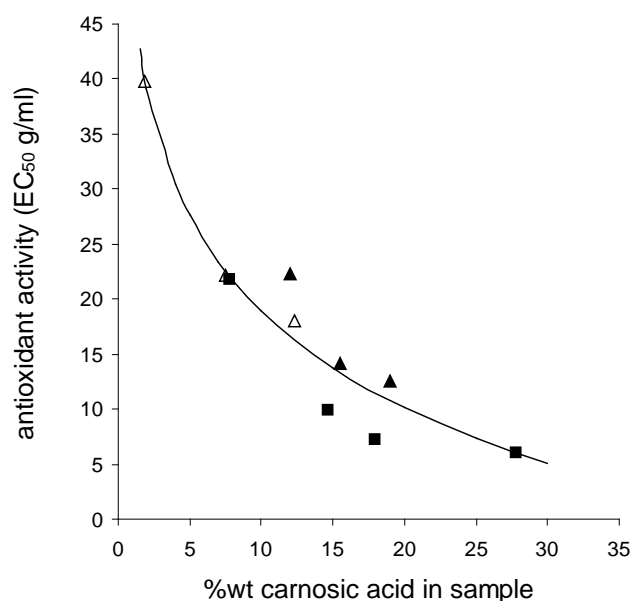
**Figure 3.** Carnosic acid content (%wt) as a function of extraction time. (■) Fractions obtained in E1; (□) fractions obtained in (S1+S2) separators of E2; (▲) S1 fractions of E2; (△) S2 fractions of E2.

The higher CA content in extraction E2 is 19% (2.2 g of extract), which was obtained in S1 separator during the last extraction period (hours 3 to 4.5). This CA content is similar to that obtained in E1 extraction during hours 4 to 6 (4.72 g of extract with 18% CA) and quite lower than the 28% CA contained in 2.40 g of extract, which was obtained in E1 during the last two hours of extraction. This means that large extraction times would be preferred than fractionation to produce samples with high CA content. After around 5 hours of extraction, the essential oil compounds (mainly terpenes and oxygenated terpenes) were almost completely removed from the plant matrix and thus, the CA content increased considerably in the samples collected. It is important to point out that previous data reported in the literature do not include data about rosemary SFE at extraction times higher than 5 h.

Additionally, is important to notice that with respect to yield, extraction E1 should also be preferred to E2: only 2.2 g of rosemary extract with 18% CA was

obtained when fractionation was accomplished but total extraction time was short (4.5 h) while 7.1 g of sample with 21.4% CA was obtained during hours 4 to 8 of E1 extraction.

The antioxidant activities of the different fractions obtained increase with increasing CA content (see Tables 1 and 2). The  $EC_{50}$  values obtained can be correlated with the amount of CA contained in the sample (Figure 4). The type of correlation obtained is similar to that reported by Caverio et al. (2005), although in our experiments much higher CA concentrations were obtained. The correlation depicted in Figure 4 is  $EC_{50} = -12.575 \ln(\%wtCA) + 47.872$  with  $R^2 = 0.92$ . Indeed, other compounds with antioxidant activity, such as carnosol or methyl carnosate, could be present in the extracted fractions. Yet, the correlation depicted in Figure 4 indicates that carnosic acid is one of the main compounds that set the antioxidant activity of rosemary extracts.



**Figure 4.** Antioxidant activity ( $EC_{50}$  values) of the different fractions obtained at 30 MPa and 313 K as a function of carnosic acid content. (■) E1; (▲) S1 separator of E2; (△) S2 separator of E2.



## Conclusions

SFE rosemary extracts were obtained in a pilot-scale plant of 2 L capacity at 30 MPa, 313 K and processing 0.6 kg of grinded rosemary leaves. Pure SCCO<sub>2</sub> was employed as solvent; its flow rate (2.4 kg/h) was set according to the extraction cell dimensions and following a scaling correlation from the literature. Global extraction yield achieved proved to be as high as the ones obtained in analytical or low-scale equipments, although higher extraction time was necessary. This slower kinetic behavior in comparison with low-scale extractions (Carvalho y col., 2005; Bensavia y col., 2009) could be attributed to the higher size of solid particles employed, which make the process to be controlled mainly by the solute diffusion in the solid phase.

The antioxidant activity of the fractions extracted showed to be directly related with the carnosic acid content and revealed a significant increase with extraction time.

Two experiments were carried out at the same extraction conditions: one with no fractionation of the extract but employing large extraction time, and the second using extract fractionation but shorter extraction time. Comparison of both experiments demonstrated that large extraction times would be preferred than fractionation to produce samples with high carnosic acid content.

## Acknowledges

This work has been financed by Universidad Autónoma de Madrid and Comunidad Autónoma de Madrid (ALIBIRD-S2009/AGR-1469) and project FUN-C-FOOD, CSD2007-00063 (CONSOLIDER-INGENIO) from Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain.

### 5.1.3 Supercritical fractionation of rosemary extracts to improve antioxidant activity

**Gonzalo Vicente**, Mónica R. García-Risco, Tiziana Fornari, Guillermo Reglero

*Chemical Engineering Technology* 2012, 35, No. 1, 176–182

#### **Abstract**

A supercritical CO<sub>2</sub> pilot plant was employed to extract rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) leaves and to thoroughly study the effect of time on the yield, composition and antioxidant activity of the different fractions produced. Six extractions assays were carried out varying the fractionation procedure using a two-stage depressurization system coupled to the extractor vessel.

The concentration of the main antioxidant compound in rosemary, namely carnosic acid, and the DPPH test were employed to value the antioxidant power of the different fractions obtained. The goal has been a new fractionation scheme, comprising two different periods of time, in which the exhaustion of the essential oil from plant matrix was achieved, while the recovery of the antioxidant compounds was maximized.

## 1. Introduction

Among the natural sources of bioactive compounds, many herbs have been applied in folk medicine since ancient times because they have been recognized to have medicinal properties (antiseptic, antifungal and antimicrobial). More recently it has become clear that another valuable property of many spices, for example rosemary, sage, thyme, clove, oregano, is that they contain natural antioxidants.

Antioxidant compounds in food play a very important role. Oxidation is one of the major causes of chemical spoilage, resulting in rancidity and/or deterioration of the nutritional quality, color, flavor, texture and safety of foods. Modern consumers ask for natural products, free of synthetic additives, and therefore several spices and some herbs have received increased attention as sources of effective natural antioxidants. But besides their role as food stabilizers, they can protect cells against the effects of free radicals and thus, play an important role in heart disease, cancer and other diseases (Suhaj. 2006).

Indeed, supercritical fluid technology is the most innovative method to recover bioactive compounds for use as supplements for functional foods. Extraction of plant material using supercritical CO<sub>2</sub> (SC-CO<sub>2</sub>) has been the subject of several publications; the reader is referred to recent reviews presented in references (Reverchon y De Marco., 2006; Pourmortazavi y Hajimirsadeghi., 2007; Herrero y col., 2006). Particularly, SC-CO<sub>2</sub> extraction to recover antioxidant compounds from different Lamiaceae herbs is being a matter of continuous research (Babovic y col., 2010).

Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) has been recognized as one of the Lamiaceae plants with large antioxidant activity. Main substances associated with the antioxidant activity are the phenolic diterpenes such as carnosol, rosmanol, carnosic acid, methyl carnosate, and phenolic acids such as the rosmarinic and caffeic acids (Ibañez y col., 2003; Terpinic y col., 2009; Szumny y col., 2010; Napoli y col., 2010; Zaouali y col., 2010). Particularly, carnosic acid has been recognized as the most abundant antioxidant compound present in rosemary extracts.

Different authors (Carvalho y col., 2005; Reverchon y Sanatore., 1992) compared supercritical rosemary extracts with those obtained using liquid solvents

(ethanol and hexane) or hydrodistillation, and demonstrated the superior antioxidant activity of the supercritical extracts.

The SC-CO<sub>2</sub> extraction of rosemary leaves to produce natural antioxidant products has been widely studied and reported in the literature (Carvalho y col., 2005; Reverchon y Sanatore. 1992; Ibañez y col., 1999; Cavero y col., 2005; Yesil-Celiktas y col., 2007; Chang y col., 2008; Bensebia y col., 2009; Herrero y col., 2010; García-Risco y col., 2011; Ivanovic y col., 2009; Visentin y col., 2011). Furthermore, SC-CO<sub>2</sub> extraction is being employed by several companies to produce rosemary antioxidant extracts. Despite the commercial and scientific interest on the antioxidant compounds present in rosemary, small amount of work has been reported about the solubility of such substances in SC-CO<sub>2</sub> (Reverchon y col., 1995).

Definitely, the antioxidant power of the extracts produced depends not only on process conditions, but also on the origin of the raw material employed. For example, Carvalho (2005) studied the supercritical extraction of organic cultivated rosemary (Sao Paulo, Brazil) in low-scale extraction cells of diverse size. Different extraction conditions were applied, and an extract containing around 20 % wt of carnosic acid was obtained at 30 MPa, 313 K, using pure CO<sub>2</sub> and without any fractionation of the extract. The overall extraction yield obtained was 0.05 g of extract per g of plant material loaded to the extraction cell (5 %wt).

In general, lower yields and concentrations of carnosic acid were obtained by other authors. Celiktas (2007) extracted antioxidant fractions from rosemary leaves collected from different locations of Turkey, and at different harvesting time intervals: at 35 MPa, 373 K and with 5% of methanol as co-solvent, the carnosic acid content in the extracts varied from 0.5 to 11.6 % wt. The rosemary plants studied by Chang (2008) were grown in experimental fields of Taiwan; they explore pressures in the range of 20-35 MPa and temperatures of 313-343 K; the best antioxidant extract was obtained at 35 MPa and 343 K, with 4.3% overall yield and carnosic acid content of 3.5 % wt. In previous work (García-Risco y col., 2011), we extracted rosemary leaves from Murcia (Spain) in a pilot-scale plant at 30 MPa, 313 K and with pure CO<sub>2</sub>, obtaining an overall extraction yield of 4.5 % and a carnosic acid content around 10 % wt.

Furthermore, fractionation of the extract has been proved to be an efficient procedure to concentrate the phenolic compounds in one fraction and thus, a product with improved antioxidant power can be obtained. In general, fractionation was accomplished by applying different conditions in two time sequential extractions (sequential fractionation) or by producing a cascade decompression of the extract in two or more separator vessels (on-line fractionation). For example, Ibañez y col., (1993) used sequential fractionation to isolate volatiles at 10 MPa and 313 K, while the antioxidant fraction was obtained at 40 MPa and 323 K without using a cosolvent. Ivanovic (2009) employed similar sequential fractionation scheme: a first fraction comprising essential oils was extracted at a pressure of 11.5 MPa and 313 K, following by the antioxidant fraction which was extracted at 30 MPa and temperatures in the range 313-373 K.

On-line fractionation in a two-step depressurization system was studied by Cavero (2005): extractions were carried out at 15-35 MPa and 313-323 K, with 0-7 % of ethanol; the antioxidant fraction was isolate in the first separator (7.5-14 MPa), while the volatiles were recovered in a second separator (2 MPa). The best separation was achieved when the highest extraction pressures and no cosolvent were employed.

Despite the origin of rosemary leaves, the selected extraction conditions or the fractionation method applied, it has to be taken into account that the composition of the extracted material varies significantly with extraction time. Decreasing percentages of lighter compounds (terpenes and oxygenated terpenes) were found as extraction time increase, while higher-molecular-weight compounds (diterpenes and sesquiterpenes and oxygenated derivatives) showed a continuous percentage increase at increasing extraction times (Brand-Williams y col., 1995). Thus, on-line fractionation of rosemary extracts should also vary with time in order to produce a selective separation of the antioxidant substances and maximize their yield and concentration.

In previous work (García-Risco y col., 2011), we studied the kinetic behavior of rosemary supercritical extracts with respect to yield, antioxidant activity and carnosic acid content. Extractions were carried out without cosolvent, at 30 MPa and 313 K, and during 8 hours. A significantly increase of carnosic acid concentration was

observed, from 7.8 % wt in the fraction collected during the first two hours to 28.0 % wt in the fraction collected during the last two hours. Consequently, the antioxidant activity of the fractions collected increased considerably with increasing extraction time.

Based in these results, a novel fractionation procedure was investigated in this work, in which two different fractionation schemes are combined, in order to maximize not only the antioxidant activity but also yield of the rosemary antioxidant fraction produced.

## **2. Materials and methods**

### **2.5 Chemicals**

2, 2- Diphenil-1-ptycril hydrazyl hydrate (DPPH, 95% purity) were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Carnosic acid ( $\geq 96\%$ ) was purchased from Alexis Biochemical (Madrid, Spain). Ethanol and phosphoric acid (85%) were HPLC grade from Panreac. Acetonitrile was HPLC grade from Lab Scan (Dublin, Ireland). CO<sub>2</sub> (N38) was supplied from Air Liquid.

### **2.6 Rosemary leaves preparation**

The rosemary sample (*Rosmarinus officinalis L.*) consisted of dried rosemary leaves (water content < 5 % wt) obtained from an herbalist's producer (Murcia, Spain). The sample was ground in a cooled mill and sample was sieving to the appropriate size (between 200 and 600  $\mu\text{m}$ ).

### **2.3 Supercritical extraction and on-line fractionation procedure**

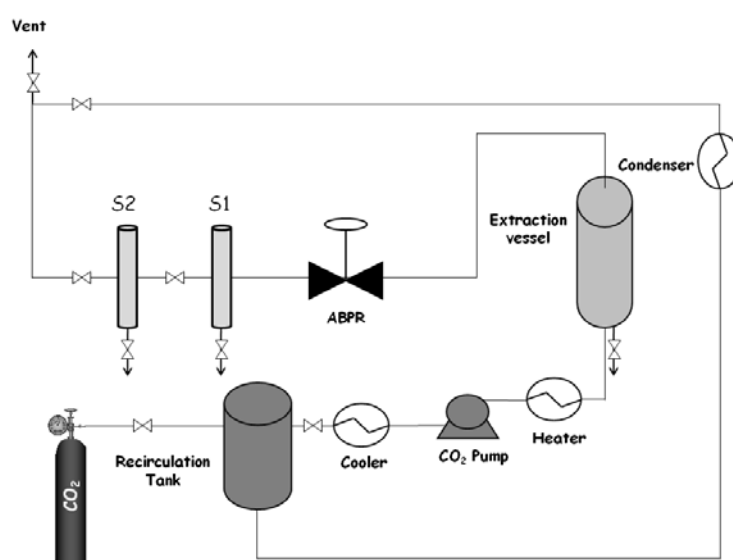
Extractions were carried out using a pilot-plant supercritical fluid extractor (Thar Technology, Pittsburgh, PA, USA, model SF2000) comprising a 2 L cylinder extraction cell and two different separators (S1 and S2), each of 0.5 L capacity, with independent control of temperature ( $\pm 2$  K) and pressure ( $\pm 0.1$  MPa). Figure 1 presents a simplified scheme of the supercritical extractor employed. The extraction device also includes a recirculation system, where CO<sub>2</sub> is condensed and pumped up to

the desired extraction pressure. For each experiment, the extraction vessel was packed with 0.55 kg of rosemary. Extraction assays were performed at 30 MPa and 313 K, with an upwards  $\text{CO}_2$  flow rate of 60 g/min. Temperature was set to 313 K in both S1 and S2 separators. According to previous kinetic studies (García-Risco y col., 2011) the overall extraction time was set to 5 h.

Six SC- $\text{CO}_2$  extractions were carried out at the extraction conditions given above, but varying the on-line fractionation scheme, as reported in Table 1.

Extraction 1 was carried out with no fractionation of the extract, and thus all extracted material was recovered in the first separator (S1), which was maintained at the recirculation system pressure (5 MPa).

On-line fractionation of the extract was accomplished in Extractions 2 to 6, but the fractionation period (EP1 hours) was varied, starting with EP1=1 in Extraction 2, up to Extraction 6 in which fractionation was carried out during the whole extraction time (EP1=5). During the fractionation period, S1 was set to 10 MPa, while S2 was maintained at the recirculation pressure. After period EP1, the pressure in S1 separator was lowered down to  $\text{CO}_2$  recirculation pressure (5 MPa). Two different extracts were collected in separators S1 and S2. Ethanol was used to wash out the separators and ensure a complete recovery of the material precipitated in each cell. Ethanol was eliminated by evaporation and the homogeneous solid samples obtained were kept at  $-20^\circ\text{C}$  under  $\text{N}_2$  and in the dark until analysis.



**Figure 1.** Scheme of the SFE experimental device.

**Table 1.** Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of rosemary leaves at 313 K and 30 MPa: fractionation period (EP1) and extraction yields obtained. Total extraction time = 5 h. Extraction yield is referred to the plant raw material loaded to the extraction cell.

Ext.	EP1 (hours)	Extraction yield in separators (%)		Overall extraction yield (%)
		S1	S2	S1 + S2
1	0	4.35	-	4.35
2	1	2.80	1.42	4.22
3	2	1.62	2.28	3.90
4	3	1.31	2.77	4.09
5	4	1.11	2.90	4.01
6	5	0.60	3.75	4.34

## 2.4 GC-MS analysis

Essential oil content and profile of samples was determined using a GC-2010 (Shimadzu, Japan). The column employed was a ZB-5 (Zebron) capillary column, 30 m x 0.25 mm I.D. and 0.25 µm phase thickness. Helium, 99.996% was used as a carrier gas at a flow of 1 ml/min and inlet pressure of 57.5 KPa. Oven temperature programming was 60°C isothermal for 4 min then increased to 106 °C at 2.5 °C/min and from 106°C to 130°C at 1°C/min and finally from 130°C to 250 °C at 20°C/min, this temperature was kept constant for 10.2 min. Sample injections (1 µl) were performed in split mode (1:20). Injector temperature was of 250°C and MS ion source and interface temperatures were 230 and 280°C, respectively. The mass spectrometer was used in TIC mode, and samples were scanned from 40 to 500 amu. The compounds were identified by comparison with mass spectra from Wiley 229 library. GC-MS analyses were carried out by duplicate and the average standard deviation obtained was ± 0.08%.

## 2.5 HPLC analysis

The carnosic acid content in the samples was determined using an HPLC (Varian Pro-star) equipped with a Microsorb-100 C<sub>18</sub> column (Varian) of 25 cm x 4.6 mm and 5 µm particle size. The analysis is based on the work of Almela (2006).



The mobile phase consisted of acetonitrile (solvent A) and 0.1% of phosphoric acid in water (solvent B) applying the following gradient: 0–8 min, 23% A, 8–25 min, 75% A, 25–40 min 75% A and the 40–45 min 23% A. Initial conditions were gained in 5 min. The flow rate was constant at 0.7 ml/min. Injection volume was 20  $\mu$ l and the detection was accomplished by using a diode array detection system (Varian) storing the signal at a wavelength of 230, 280 and 350 nm. Quantification of carnosic acid was performed by a calibration curve of the pure standard in all samples ( $y = 2.62 \cdot 10^8 \cdot X - 1.05 \cdot 10^6$ ,  $R^2 = 0.998$ ). Samples were analyzed by HPLC in duplicate and the obtained average standard deviation was  $\pm 0.13\%$ .

## 2.6 Antioxidant activity by the DPPH test

The method consists in the neutralization of free radicals of DPPH by an antioxidant sample (Brand-Williams y col., 1995). An aliquot (50  $\mu$ l) of ethanol solution containing 5–30  $\mu$ g/ml of rosemary extract, was added to 1.950  $\mu$ l of DPPH in ethanol (23.5  $\mu$ g/ml) prepared daily. Reaction was completed after 3 h at room temperature and absorbance was measured at 517 nm in a Nanovette Du 730 UV spectrophotometer (Beckman Coulter, USA). The DPPH concentration in the reaction medium was calculated from a calibration curve determined by linear regression ( $y = 0.0265 \cdot x$ ;  $R^2 = 0.9998$ ). Ethanol was used to adjust zero and DPPH-ethanol solution as a reference sample. The amount of extract necessary to decrease the initial DPPH concentration by 50% or  $EC_{50}$  ( $\mu$ g/ml) was determined and employed to value the antioxidant power of the sample; the lower the  $EC_{50}$ , the higher the antioxidant power.

## 3. Results and discussion

As mentioned before, the extraction temperature and pressure were kept constant at 30 MPa and 313 K during Ext. 1 to 6 (see Table 1) but the depressurization procedure adopted to fractionate the material extracted was varied with respect to time.

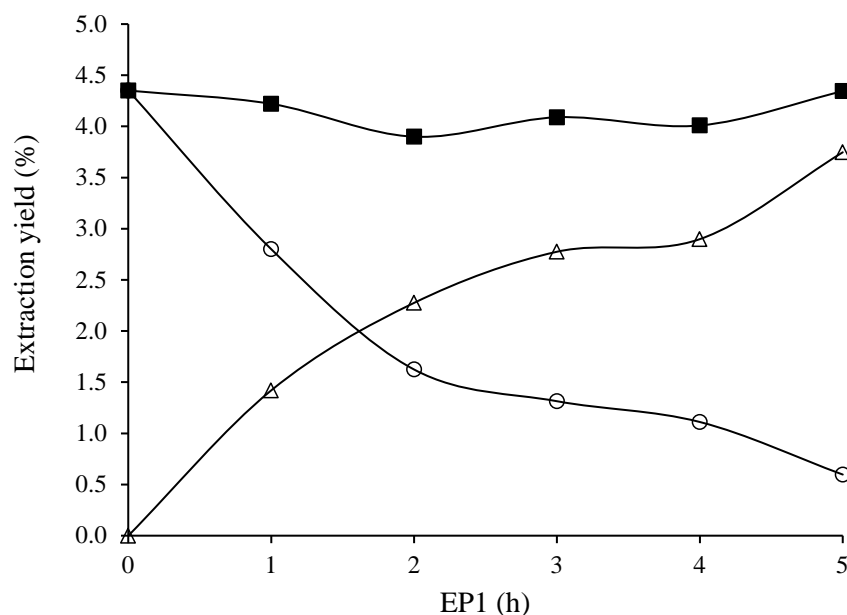
Two different extraction periods were considered. During the first extraction period (EP1 hours) pressure was set to 10 MPa in the first separator (S1) while the second separator (S2) was maintained at the recirculation system pressure (5 MPa).

Thus, during EP1, fractionation of the material extracted from the plant matrix is produced by an on-line cascade decompression. Due to the lower solubility of the antioxidant compounds (phenolic-type substances) in comparison to the essential oil compounds (mainly monoterpenes) it is apparent that the antioxidants would precipitate in S1, while the essential oil would be mainly recovered in S2.

During the rest of the extraction (the second extraction period is  $EP2 = 5 - EP1$ ) the extract is no further fractionated, S1 pressure is lowered down to  $CO_2$  recirculation pressure, and thus, all the substances extracted were precipitated in S1 and mixed with the material that had been already recovered in S1 during EP1.

As shown in previous work (García-Risco y col., 2011), the antioxidant activity of the extracted material increase as extraction time increase. This could be attributed to the exhaustion of the volatile oil from plant matrix and the consequent concentration of phenolic-type compounds. Thus, the extent (hours) of EP1 was varied to determine the fractionation time required in order to remove the essential oil compounds from the rosemary leaves matrix. The extent of EP1 in the different supercritical extraction assays is indicated in Table 1.

Figure 2 show the extraction yield attained in S1 and S2 as a function of the fractionation time (EP1). The overall extraction yield obtained, i.e. considering S1 and S2 extracts, was 4.15 %, which is the mean value of Ext. 1 to 6 given in Table 1 (standard deviation = 0.18). With respect to extraction yield, as expected, the amount of material recovered in S1 decreases when EP1 increases, whilst the mass recovered in S2 increases. Thus, the lowest yield was obtained in S1 (i.e. the separator in which it is expected to recover the antioxidant compounds) when fractionation was accomplished during the whole extraction time (Ext. 6 on Table 1).



**Figure 2.** Extraction yields obtained in the supercritical fractionation of rosemary extracts: (○) S1 separator; (△) S2 separator; (■) overall extraction yield.

The results obtained from the analysis of the volatile oil fraction are given in Tables 2 and 3. According to Table 2, considering the % areas of the identified substances, the main components comprising rosemary essential oil are 1,8 cineole and camphor, followed by borneol and  $\alpha$ -terpineol. Further, similar % area were obtained in most of the samples analyzed and thus, it could be stated that the volatile oil composition of fractions collected is rather similar (see Table 2). Nevertheless, it has to be pointed out that the ratio (total area identified in S2) / (total area identified in S1) is 1.6 (Ext. 2) to 6.2 (Ext. 6) signifying that, as EP1 increases, significantly lower amounts of volatile oil compounds are recovered in S1.

**Table 2.** Volatile essential oil compounds identified by GC-MS in rosemary extracts.

retention time	component <i>i</i> identification	% Area											
		Ext 1		Ext 2		Ext 3		Ext 4		Ext 5		Ext 6	
		S1	S1	S2	S1	S2	S1	S2	S1	S2	S1	S2	
8.148	$\alpha$ -pinene	1.32	0.81	0.37	0.80	1.83	1.50	0.95	1.48	1.14	n.d.	1.00	
13.083	limonene	1.33	1.34	0.84	1.20	1.25	1.70	1.59	1.11	1.14	n.d.	1.28	
13.191	1,8 cineole	53.1	59.2	37.1	59.3	49.4	62.9	50.4	64.1	47.5	72.0	50.2	
17.243	linalool	1.01	1.18	1.77	1.09	1.36	1.17	1.37	1.17	1.51	n.d.	1.34	
19.645	camphor	19.2	19.8	25.8	20.6	22.6	20.1	22.2	21.7	22.4	28.0	21.4	
20.933	borneol	6.79	4.26	8.69	4.97	6.14	2.95	5.96	2.48	6.78	n.d.	6.48	
21.626	terpineol	1.72	0.94	2.10	1.00	1.48	0.84	1.54	0.97	1.66	n.d.	1.67	
22.411	$\alpha$ -terpineol	6.29	4.40	8.84	4.47	6.30	3.46	6.06	2.60	6.91	n.d.	6.29	
23.400	verbenone	3.35	3.64	5.81	3.10	3.96	2.78	4.02	2.74	4.33	n.d.	4.34	
37.622	$\beta$ -caryophyllene	3.39	1.91	6.29	2.20	4.05	1.93	4.22	1.34	4.40	n.d.	4.00	
58.245	ferruginol	1.69	1.47	0.92	0.82	0.69	0.62	0.68	0.30	1.09	n.d.	0.99	
Total absolute area x 10 <sup>-6</sup>		3.1	2.9	4.8	3.1	7.4	3.3	7.8	3.3	6.0	0.8	5.0	

n.d.: non detected

Table 3 gives, for each component *i*, the ratio  $r_i$  between its chromatographic area in the different fractions collected and its chromatographic area in fraction S1 of Ext. 1 (i.e. the experiment in which no fractionation was accomplished). Since all samples were injected at the same concentration in the GC-MS system,  $r_i$  is a relative measurement of the concentration of component *i* in the corresponding fraction. According to Table 3, the main constituents of rosemary essential oil are concentrated in S2 separator: a 2-3 fold increase is observed for several substances, such as 1,8 cineol, linalool, camphor, borneol, verbenone and  $\beta$ -caryophyllene. On the contrary, in S1 fractions the concentration factors ( $r_i$ ) of the essential oils compounds are in general lower than 1.

The concentration of the main antioxidant compound detected in the HPLC analysis (carnosic acid) is reported in Table 4, together with the EC<sub>50</sub> values resulted from the DPPH analysis. Carnosol was also identified as an antioxidant compound present in the samples, but very low amounts of this substance was determined (< 2 %wt).

Considering the total amount of carnosic acid (CA) extracted in Ext. 1 to 6 of Table 1 (mean value of 2.4 g with a standard deviation of 0.2) and effective solubility of 0.13 g CA / kg CO<sub>2</sub> at 30 MPa and 313 K was estimated. The solubility of CA in SCCO<sub>2</sub> with ethanol cosolvent has been reported previously (Reverchon y col., 1995) extrapolation of these data to zero ethanol content provides a solubility of 0.04 g CA / kg CO<sub>2</sub>, that is around three times lower than the value estimated from the extractions assays carried out in this work.

As expected, the EC<sub>50</sub> values of S1 fractions are significantly lower than the EC<sub>50</sub> values of S2 fractions, indicating that a selective precipitation of the antioxidant compounds was achieved in S1 separator. Nevertheless, no significant improvement of the antioxidant activity of the fractions collected in S1 is observed when EP1 is larger than 1 hour. Figure 3 shows the amount of CA recovered in the different samples obtained.

**Table 3.** Concentration factors ( $r_i$ =chromatographic area in sample/ chromatographic area of S1 Ext1 sample) obtained for the volatile essential oil compounds identified by GC-MS.

retention time	component <i>i</i> identification	Concentration factor, $r_i$									
		Ext 2		Ext 3		Ext 4		Ext 5		Ext 6	
		S1	S2	S1	S2	S1	S2	S1	S2	S1	S2
8.148	$\alpha$ -pinene	0.59	0.44	0.61	3.31	1.23	1.83	1.18	1.69	n.d.	1.21
13.083	limonene	0.97	0.98	0.92	2.26	1.39	3.04	0.89	1.67	n.d.	1.55
13.191	1,8 cineole	1.06	1.08	1.13	2.22	1.28	2.41	1.28	1.74	0.35	1.52
17.243	linalool	1.12	2.70	1.09	3.21	1.26	3.42	1.22	2.91	n.d.	2.12
19.645	camphor	0.99	2.08	1.09	2.82	1.13	2.94	1.20	2.28	0.38	1.80
20.933	borneol	0.60	1.98	0.74	2.16	0.47	2.23	0.39	1.94	n.d.	1.53
21.626	terpineol	0.52	1.88	0.58	2.05	0.52	2.27	0.60	1.88	n.d.	1.56
22.411	$\alpha$ -terpineol	0.67	2.17	0.72	2.39	0.59	2.44	0.44	2.14	n.d.	1.61
23.400	verbenone	1.04	2.69	0.94	2.83	0.90	3.05	0.86	2.52	n.d.	2.08
37.622	$\beta$ -caryophyllene	0.54	2.87	0.66	2.86	0.62	3.16	0.42	2.53	n.d.	1.90
58.245	ferruginol	0.83	0.85	0.49	0.97	0.40	1.03	0.19	1.25	n.d.	0.94

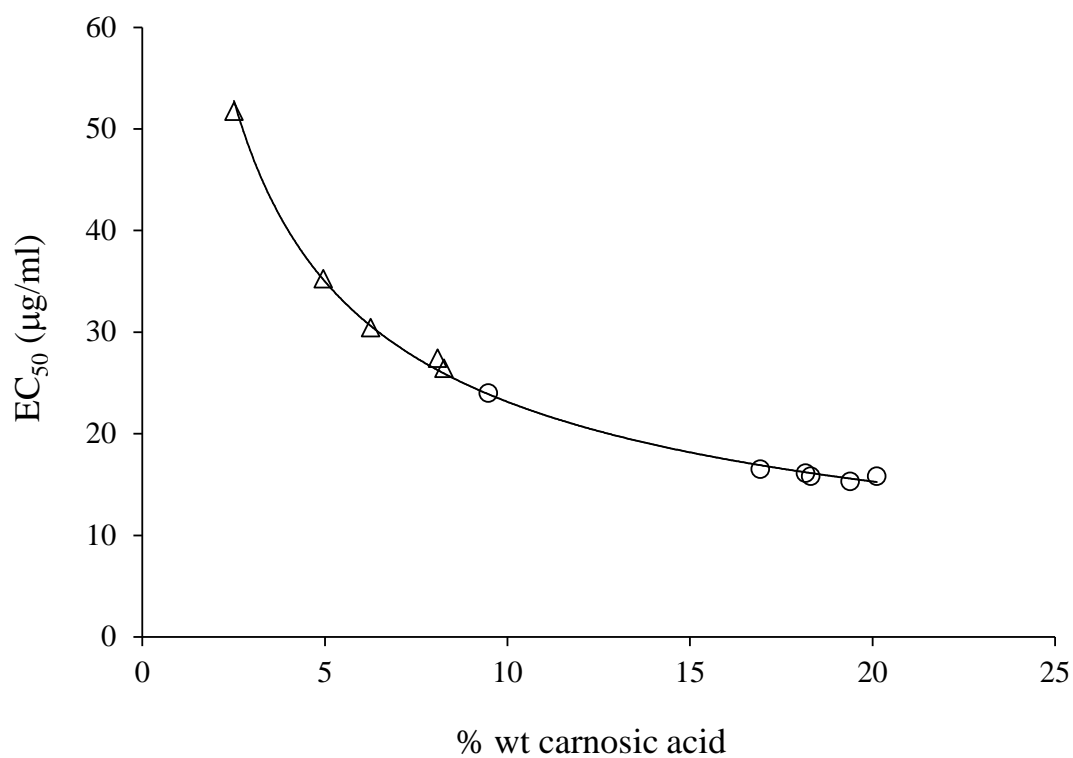
n.d.: non detected

In accordance with the lower  $EC_{50}$  values obtained for the material recovered in S1 separator, it was obtained that carnosic acid is more favorable concentrated in S1 extracts (9 - 20 % wt) than in S2 fractions (2 - 8 % wt). Furthermore, the  $EC_{50}$  values of the fractions collected can be correlated with the carnosic acid content (see Figure 3) as was previously referred in the literature (Cavero y col., 2005; García-Risco y col., 2011).

As a result, it can be established that on-line fractionation is appropriate just during the first hour of extraction, since for  $EP1 \geq 1$  the antioxidant activity of the fraction collected in S1 separator remains almost constant ( $EC_{50} \approx 16$ ). That is, once the essential oil compounds are removed from the plant matrix, the composition of the extracted material remains almost constant during the rest of the extraction and thus, the similar concentration of antioxidants provide similar antioxidant activity. Furthermore, the yield of the fraction collected in separator S1 of Ext. 2 is 4.7 times higher, but with similar antioxidant activity, than the fraction obtained in Ext. 6 in which fractionation was accomplished during the whole extraction time.

**Table 4.** Supercritical  $CO_2$  extraction of rosemary leaves at 313 K and 30 MPa: carnosic acid content (% wt) and  $EC_{50}$  values of all fractions collected.

Ext.	EP1 (hours)	% wt carnosic acid		$EC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	
		S1	S2	S1	S2
1	0	9.48	-	24.0	-
2	1	16.93	2.51	16.5	51.7
3	2	18.17	4.96	16.1	35.2
4	3	20.12	6.25	15.8	30.4
5	4	18.31	8.09	15.8	27.4
6	5	19.39	8.26	15.3	26.4



**Figure 3.** Correlation between EC<sub>50</sub> values and % wt carnosic acid (CA) of the rosemary fractions produced in Ext. 1 to 6: (○) S1 separator; (△) S2 separator.  $EC_{50} = 91.331 \cdot CA^{-0.596}$ ,  $R^2 = 0.9968$ .

### Conclusions

The fractionation of rosemary supercritical extracts to get a product with high antioxidant activity was studied. Extractions were carried out at 313 K and 30 MPa, but varying the fractionation procedure using a two-stage depressurization system. The fractionation scheme proposed comprises two different periods of time. During the first period exhaustion of the essential oil from plant matrix was achieved, whilst the antioxidant compound were precipitated in the first separator cell. In the second period the extract was precipitated in the first separator and mixed with the material recovered during the first period. Using this procedure, a fraction was produced which contains a 2-fold increase of carnosic acid content in comparison with the product obtained when no fractionation is applied. Further, the yield of the antioxidant fraction produced is almost double the one obtained when fractionation is applied during the whole extraction time.

### Acknowledges

This work has been financed by project AGL2010-21565 (subprogram ALI) and project INNSAMED IPT-300000-2010-34 (subprogram INNPACTO) from Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain).



## 5.2 Extracción supercrítica de romero utilizando co-solvente (etanol) y aplicaciones de los extractos obtenidos

### 5.2.1 Prefacio

La extracción supercrítica es reconocida como una técnica adecuada para la extracción de compuestos fenólicos a partir de hojas de romero (Yesil-Celiktas y col., 2007). Sin embargo, la baja solubilidad en CO<sub>2</sub> supercrítico de algunos compuestos antioxidantes limita los rendimientos de extracción. Si bien el fraccionamiento llevado a cabo (sección 5.1) permitió aumentar selectivamente la concentración de ácido carnósico y mantener un rendimiento de extracción adecuado, el análisis cinético permitió observar que durante las 8 horas de extracción estudiadas la masa extraída del antioxidante más abundante del romero (ácido carnósico) mantiene una tendencia lineal, lo que indica que esta sustancia no ha sido agotada en su totalidad de la matriz vegetal.

Para aumentar la recuperación de antioxidantes, varios autores proponen la adición de un co-solvente polar, como por ejemplo el etanol (Cavero y col., 2005; Herrero y col., 2010; Visentin y col., 2011). Si bien el uso de etanol como co-solvente aumentará la solubilidad de las sustancias polares en la fase móvil, hay que tener en cuenta también que, en altas concentraciones, puede afectar también a la selectividad de la extracción, tal como sucede en las extracciones ASE o ESL, y puede dar lugar a la co-extracción de una mayor cantidad de compuestos no deseados.

En los artículos que se exponen a continuación se describe las extracciones llevadas a cabo con diferentes porcentajes de etanol, utilizando distintos tiempos y esquemas de extracción y fraccionamiento. Esto permitió obtener una variedad de extractos con diferente contenido de antioxidantes y aceite esencial y, por lo tanto, diferente capacidad antioxidante. En base a esta caracterización de los extractos se seleccionaron algunos de ellos para estudiar la relación entre la composición del extracto supercrítico y su actividad como conservante natural de aceites comestibles, así como la actividad antiproliferativa que presentan sobre células cancerígenas hepáticas, dando lugar a los artículos *“Supercritical Rosemary extracts as antioxidant*

*for use in edible vegetable oil” y “Supercritical rosemary extracts, their antioxidant activity and effect on hepatic tumor progression”.*

La primera de las aplicaciones se fundamenta en el interés actual por sustituir los antioxidantes alimentarios sintéticos por productos de origen natural. Además, ha sido motivada por la reciente Directiva 2010/67/EU que asigna a los extractos de romero el número de aditivo alimentario E-392. En esta tesis, se estudió la estabilidad oxidativa de aceites comestibles, seleccionados en base a su alto contenido en ácidos poliinsaturados, a los que se les adicionó diferentes extractos supercríticos de romero en distintas concentraciones. Los aceites, aceite de lino (AcL), aceite de sésamo (AcS) y aceite de semilla de uva (AcU), se sometieron a una oxidación controlada por método de Rancimat y se estudió el efecto del extracto añadido en su estabilidad oxidativa. En este estudio se observó que no existe una tendencia general ya que el efecto antioxidante del extracto de romero era diferente para cada tipo de aceite y estaba estrechamente relacionado con la composición en ácidos grasos de cada uno de los aceites.

El segundo de los trabajos que se presenta en esta sección, constituye una aplicación de los extractos de romero supercrítico obtenidos por los diferentes métodos en el campo en biomedicina. En esta aplicación se seleccionaron varios extractos para analizar la posible relación entre su composición y capacidad para inhibir la proliferación de células cancerígenas hepáticas. Los extractos mostraron un efecto dosis-dependiente, es decir, que las concentraciones correspondientes a la inhibición del crecimiento (GI50), sensibilidad de las células (IC50) y citostaticidad (TGI), calculadas de acuerdo a las definiciones de la agencia NIH, eran menores a medida que aumenta el contenido en ácido carnósico en los extractos.

En las dos aplicaciones seleccionadas, se observó que los efectos producidos estaban significativamente influidos por la composición del extracto, lo que sugiere un papel muy relevante de las condiciones de operación utilizadas para su producción.

### 5.2.2 Supercritical carbon dioxide extraction of antioxidants from rosemary (*Rosmarinus officinalis*) leaves for use in edible vegetable oils

**Gonzalo Vicente**, Diana Martín, Mónica R. García-Risco, Tiziana Fornari, Guillermo Reglero

*Journal of Oleo Science*, 2012. Aceptado y en prensa.

#### Abstract

Supercritical extraction was employed to produce rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extracts with different composition and antioxidant activity. CO<sub>2</sub> was utilized as supercritical solvent and diverse extraction conditions (temperature, pressure, amount of cosolvent and fractionation scheme) were applied. The extracts with higher antioxidant content were selected to study their capability as natural antioxidant of several commercial edible vegetable oils. Linseed oil (LO), grape seed oil (GO) and sesame oil (SO) were oxidized under Rancimat conditions in presence of 0, 100, 200 and 300 mg/kg of selected extracts. Antioxidant activity index (AAI) was estimated as the ratio of induction time in presence of extracts to induction time in absence of extract. Induction time in absence of extracts was 3.3, 7.9 and 23.4 h for LO, GO and SO, respectively. Regardless of these different susceptibilities, the highest AAI for the three oils was obtained for the extract with the highest antioxidant-enrichment (33.25% carnosic acid plus carnosol) and added at the highest level (300 mg/kg). However, at such conditions, the AAI was significantly higher ( $p < 0.001$ ) for LO (3.5), followed by SO (2.2) and the poorest value was for GO (1.1). Therefore, the magnitude of the AAI depended on the antioxidant-enrichment of the extracts, the level of addition within the oils, but also on the own individual oils.

## 1. Introduction

Antioxidant compounds in food play a very important role. Oxidation is one of the major causes of chemical spoilage, resulting in rancidity and/or deterioration of the nutritional quality, color, flavor, texture and safety of foods. Modern consumers ask for natural products, free of synthetic additives, and therefore several spices and some herbs have received increased attention as sources of effective natural antioxidants (Suhaj. 2006; Ahn y col., 2002).

Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) has been recognized as one of the *Lamiaceae* plants with large antioxidant activity. Main substances associated with the antioxidant activity are the phenolic diterpenes such as carnosol, rosmanol, carnosic acid, methyl carnosate, and phenolic acids such as the rosmarinic and caffeic acids (Reverchone y De Marco. 2006; Pourmortazavi y Hajimirsadeghi. 2007; Thorsen y col., 2006; Babovic y col, 2010). Particularly, carnosic acid and carnosol are the most abundant antioxidant compounds present in rosemary (Ibañez y col., 2003).

Indeed, supercritical fluid technology is the best innovative method to recover bioactive compounds for use as supplements for functional foods (Terpinic y col., 2009; Szumny y col., 2010). Different authors (Cavero y col., 2005; Zaouali y col 2010) compared rosemary supercritical extracts with those obtained using liquid solvents (ethanol and hexane) or hydrodistillation, and demonstrated the superior antioxidant activity of the supercritical extracts.

Recently, the European Commission published Directive 2010/67/EU of 20 October 2010 and informed on the safety of rosemary extracts when used as an antioxidant in foodstuffs. Such document establishes appropriate specifications to authorize rosemary extracts as a new food additive for use in foodstuffs, and assigned E 392 as its E number. Moreover, several types of production process are described, using solvent extraction (ethanol, acetone and hexane) and also supercritical CO<sub>2</sub> extraction. Thus, according to Directive 2010/67/EU, supercritical rosemary extracts for use as food additive should contain more than 13 % w/w of antioxidant compounds (carnosic acid + carnosol) and the antioxidant/volatiles ratio should be greater than 15.

There are several works reporting the antioxidant activity of rosemary extracts obtained by conventional methods (hydro-distillation and liquid solvent extraction) in different meat products (Riznar y col., 2006; Georgantelis y col., 2007; Sebranek y col., 2005; Thongtan y col., 2005; Nissen y col., 2000) and diverse vegetable oils, such as sunflower oil (Rizner-Hras y col., 2000), soybean oil (Ramalho y col., 2008; Gamez-Meza y col., 2009), peanut oil (Ozcan. 2003) or *Camelina sativa* oil (Abramovic y col., 2006). Nevertheless, studies specifically focused on the use of supercritical extracts are scarce. As recent example, Bavovic et al. (2010) studied the antioxidant activity of supercritical fluid extracts of rosemary, sage, thyme and hyssop extracts in preventing oxidation of sunflower oil. By means of the measurement of the oil peroxide value, the authors concluded that the best antioxidant effect was obtained with rosemary and sage. Supercritical rosemary extracts have been also shown as efficient antioxidant in wheat germ oil, leading to better results than those extracts obtained from Soxhlet procedure (Yesil-Celiktas y col., 2009). Recently, Martin et al. (2012) tested the use of supercritical rosemary extract in the protection of n-3 concentrates from fish oils, showing successful results in combination with  $\alpha$ -tocopherol.

In this work, rosemary supercritical extracts with different concentration of antioxidant compounds were produced, by using diverse extraction conditions such as temperature, pressure, amount of co-solvent (ethanol) and fractionation scheme. The antioxidant power of the extracts was evaluated by the DPPH test and also the extracts were assessed in terms of the specifications stated in Directive 2010/67/EU. Furthermore, the antioxidant power of supercritical rosemary extracts was evaluated by studying under Rancimat conditions their use as potential antioxidants of three different vegetable oils: linseed oil (LO), grapeseed oil (GO) and sesame oil (SO). The different level of polyunsaturated fatty acids (PUFA) of these oils, their nature as n-3 or n-6 fatty acids and the own presence of natural antioxidant compounds, might determine different oxidative susceptibilities of these oils, as well as different antioxidant power of exogenous-added compounds to control their loss of value. Previous data on the use of rosemary extracts on the stabilization of GO, SO or LO have not been found in the literature.

## 2. Experimental procedures

### 2.1 Chemicals and samples

2, 2- diphenyl-1-picryl hydrazyl hydrate (DPPH, 95% purity), camphor (>97%), bornyl acetate (95%) and linalool (>97%) were purchased from Sigma-Aldrich. Carnosic acid ( $\geq 96\%$ ) and carnosol was purchased from Alexis Biochemical. 1,8 cineole (98%) and borneol (>99%) were purchased from Fluka. Ethanol and phosphoric acid (85%) were HPLC grade from Panreac. Acetonitrile was HPLC grade from Lab Scan (Dublin, Ireland). CO<sub>2</sub> (N38) was supplied from Air Liquid.

LO, GO and SO were purchased from a local market. Fatty acid compositions for these oils (according to specifications of the producer) are given in Table 1. The rosemary (*Rosmarinus officinalis L.*) raw material consisted of dried leaves (water content < 5 % w/w) obtained from an herbalist's producer (Murcia, Spain). The sample was ground in a cooled mill. Sample particle size was in the range of 200 and 600  $\mu\text{m}$ .

**Table 1.** Fatty acid composition and oxidative stability of vegetable oils

	LO	GO	SO
<i>Fatty acid composition<sup>a</sup></i>			
SFA (%) <sup>b</sup>	9	12	14
MUFA (%) <sup>c</sup>	19	19	40
PUFA (%) <sup>d</sup>	72	69	46
n-6 linoleic acid	19	68	44
n-3 linolenic acid	53	1	2
PUFA/SAT	8	5.8	3.3
<i>Oxidative stability</i>			
IT (h) <sup>e,f</sup>	3.25 $\pm$ 0.05 <sup>z</sup>	7.9 $\pm$ 0.52 <sup>y</sup>	23.35 $\pm$ 0.24 <sup>x</sup>

<sup>a</sup> According to specifications of the producer

<sup>b,c, d</sup> SFA (saturated fatty acids), MUFA (monounsaturated fatty acids) and PUFA (polyunsaturated fatty acids)

<sup>e</sup> Without addition of supercritical rosemary extracts.

<sup>f</sup> Different letters between values means that averages were significantly different

## 2.2 Supercritical extraction

Extractions were carried out using a supercritical fluid pilot-plant (Thar Technology, Pittsburgh, PA, USA, model SF2000) comprising a 2 L cylinder extraction cell and two different separators (S1 and S2), each of 0.5 L capacity with independent control of temperature ( $\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) and pressure ( $\pm 0.1\text{ MPa}$ ). The extraction equipment also includes a recirculation system, where  $\text{CO}_2$  is condensed, pumped up to the desired extraction pressure and heated up to the selected extraction temperature.

The temperature of the extraction cell and separators was maintained at  $40^{\circ}\text{C}$  and  $\text{CO}_2$  flow rate was 60 g/min in all experimental assays. In selected assays, fractionation of the extracted material was accomplished by setting the pressure of the first separator (S1) to 10 MPa, while the second separator (S2) was maintained at the recirculation system pressure (5 MPa). In this case, two different samples were collected: one sample from S1 cell and the other from S2 cell. When no fractionation of the extract was accomplished, S1 was set to the recirculation system pressure and thus, only one sample was recovered from S1. Extraction conditions were selected on the basis of previous studies reported in the literature (Cavero y col., 2005; Carvalho y col., 2005; Yesil-Celiktas y col., 2007; Chang y col., 2008; Herrero y col., 2010; García-Risco y col., 2011; Vicente y col., 2012; Ivanovi y col., 2009) with respect to the supercritical fluid extraction (SFE) of rosemary leaves to produce antioxidant fractions, and are explained in detail as follows.

*Extraction 1:* Extractor pressure was 30 MPa, extraction time 360 min, and no fractionation of the extracted material was accomplished. Only one sample was collected from S1 separator (M1 sample).

*Extraction 2:* Extractor pressure was 30 MPa and fractionation of the extracted material was accomplished during the first 60 min. Then, extraction continued for 300 min without fractionation. Two samples were collected: one from S1 (M2-1 sample) and the other from S2 (M2-2).

*Extraction 3:* Extractor pressure was 15 MPa and 5 % w/w ethanol was employed as cosolvent. No fractionation of the extracted material was accomplished during 180 min of extraction. Only one sample was collected from S1 separator (M3 sample).

*Extraction 4:* Extractor pressure was 15 MPa and 10 % w/w ethanol was employed as cosolvent. No fractionation of the extracted material was accomplished during 180 min of extraction. Only one sample was collected from S1 separator (M4 sample).

*Extraction 5:* Extractor pressure was 15 MPa and no fractionation was carried out. First (60 min) no cosolvent was employed and then (120 min) 10 % w/w ethanol was used. Two samples were collected from S1 separator, corresponding to the first (M5-1 sample) and second (M5-2 sample) extraction periods.

*Extraction 6:* The residual plant matrix from Extraction 1 was utilized as raw material in this experiment. Extractor pressure was 15 MPa and 10 % w/w ethanol as cosolvent was employed. Extraction time was 180 min. No fractionation was accomplished and thus, one sample was collected in S1 separator (M6 sample).

### 2.3 GC-MS analysis

The essential oil compounds of samples were determined by GC-MS-FID using 7890A System (Agilent Technologies, U.S.A.), comprising a split/splitless injector, electronic pressure control, G4513A auto injector, a 5975C triple-Axis mass spectrometer detector, and GC-MS Solution software. The column used was an Agilent 19091S-433 capillary column, 30 m x 0.25 mm I.D. and 0.25  $\mu$ m phase thickness. Helium, 99.996% was used as a carrier gas at a flow of 29.4 ml/min and inlet pressure of 200 MPa. Oven temperature programming was 60°C isothermal for 4 min then increased to 106 °C at 2.5 °C/min and from 106°C to 130°C at 1°C/min and finally from 130°C to 250 °C at 20°C/min, this temperature was kept constant for 10 min. Sample injections (1  $\mu$ l) were performed in split mode (1:10). Injector temperature was 250°C and MS ion source and interface temperatures were 230 and 280°C, respectively. The mass spectrometer was used in TIC mode, and samples were scanned from 40 to 500 amu. Key volatiles were identified by comparison with standard mass spectra, obtained in the same conditions and compared with the mass spectra from library Wiley 229. The rest of compounds were identified by comparison with mass spectra from Wiley 229 library. A calibration curve was employed to quantify each of the key volatiles. GC-MS analyses were carried out by duplicate and the average standard deviation obtained was  $\pm$  0.08%.



## 2.2 HPLC analysis

Carnosic acid and carnosol content in the samples were determined using an HPLC (Varian Pro-star) equipped with a Microsorb-100 C<sub>18</sub> column (Varian) of 25 cm × 4.6 mm and 5 µm particle size. The analysis is based on the work of Almela et al. (2006). The mobile phase consisted of acetonitrile (solvent A) and 0.1% of phosphoric acid in water (solvent B) applying the following gradient: from 0 min to 8 min, 23% A; increasing from 8 min to 25 min up to 75% A; kept constant during 15 min, and from 40 min to 45 min, initial conditions were gained (23% A). The flow rate was constant at 0.7 ml/min. Injection volume was 20 µl and the detection was accomplished by using a diode array detection system (Varian) storing the signal at a wavelength of 230, 280 and 350 nm. Samples were analyzed by HPLC in duplicate and the obtained average standard deviation was ± 0.13%.

## 2.5 Antioxidant activity by the DPPH test

The method consists in the neutralization of free radicals of DPPH by an antioxidant sample (Brand-Williams y col., 1995). An aliquot (50 µl) of ethanol solution containing 5-30 µg/ml of rosemary extract, was added to 1.950 µl of DPPH in ethanol (23.5 µg/ml) prepared daily. Reaction was completed after 3 h at room temperature and absorbance was measured at 517 nm in a Nanovette Du 730 UV spectrophotometer (Beckman Coulter, USA). The DPPH concentration in the reaction medium was calculated from a calibration curve determined by linear regression ( $y = 0.0265 \cdot x$ ;  $R^2 = 0.9998$ ; 6 calibration points from 0 to 40 µg/mL). Ethanol was used to adjust zero and DPPH-ethanol solution as a reference sample. The amount of extract necessary to decrease the initial DPPH concentration by 50% or EC<sub>50</sub> (µg/ml) was determined and employed to value the antioxidant power of the sample; the lower the EC<sub>50</sub>, the higher the antioxidant power.

## 2.6 Antioxidant activity under Rancimat test

Selected rosemary extracts were added to vegetable oils at 0, 100, 200 and 300 mg/kg. Oils (3 g) were subjected to accelerated oxidative conditions by a Metrohm Rancimat model 743 (Herisau, Switzerland) at an airflow rate of 20 L/h and at 100°C.

The conductivity measuring cells contained 60 mL of distilled water. The induction time (IT) was automatically determined as the inflection point of the generated plot of conductivity ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) of the water versus time (h). Analyses were performed in duplicate. The antioxidant activity index (AAI) was estimated as:

$$\text{AAI} = \text{IT with antioxidant} / \text{IT without antioxidant}$$

## 2.7 Statistical analysis

Experimental supercritical extractions were carried out by duplicate in the SFE system. Standard deviations of extraction yields obtained were calculated as follows:

$$StD = \sqrt{\frac{1}{2} \times [(x_1 - \bar{x})^2 + (x_2 - \bar{x})^2]} \quad (1)$$

Being  $x_1$  and  $x_2$  the values obtained in each of the experiments and  $\bar{x}$  the corresponding average value.

Quantification of carnosic acid and key volatile oil compounds together with the antioxidant activity tests were also carried out by duplicate, employing the mixture of extracts obtained in the duplicate extraction assays. Eq. (1) was applied in order to test the reproducibility of the data obtained.

The effect of the factors “extract”, “concentration of extract”, and “type of oil” on the AAI value was evaluated by one-way analysis of variance by means of the SPSS 17.0 statistical package (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Differences were considered significant at  $p \leq 0.05$ . When the effect of any of the factors was significant, differences between groups were analyzed by Tukey’s posthoc test.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Supercritical rosemary extracts

The different conditions applied in the supercritical rosemary extraction were target to produce a sample with high content of antioxidant substances and low content of volatile oil compounds, but also with favorable production conditions such as high extraction yield, no cosolvent or low amounts of cosolvent consumption, and short extraction time. Table 2 shows the extraction yield, the carnosic acid content

and the total content (% w/w) of key volatiles (borneol, bornyl acetate, camphor, 1,8-cineol and verbenone) of the supercritical rosemary extracts produced in the Extractions 1 to 6 defined before. Moreover, the normalized composition (% peak area) of the key volatile oil compounds is detailed in Table 3. Further, low amounts of carnosol (< 3 % w/w) were obtained in all samples.

**Table 2.** Extraction yield, carnosic acid and key volatiles content (% w/w) in the supercritical rosemary samples produced.

Ext.	Sample	Yield (g extract / g rosemary leaves x 100) <sup>a</sup>	Carnosic acid content (% w/w) <sup>b</sup>	Key volatiles content (% w/w) <sup>c</sup>
1	M1	4.52 ± 0.17	10.89	12.79
2	M2-1	2.83 ± 0.18	16.90	13.59
2	M2-2	1.53 ± 0.22	3.12	21.70
3	M3	7.26 ± 0.27	25.66	10.42
4	M4	13.44 ± 0.32	14.18	4.69
5	M5-1	1.42 ± 0.30	2.00	36.92
5	M5-2	3.02 ± 0.19	28.49	4.81
6	M6	4.93 ± 0.25	30.69	2.04

<sup>a</sup> mean standard deviation < 0.24

<sup>b</sup> values reported correspond to average value between duplicates; mean standard deviation < 0.53

<sup>c</sup> values reported correspond to average value between duplicates; mean standard deviation < 0.41

As can be observed from Table 2, higher carnosic acid contents seemed to be obtained when ethanol was employed as CO<sub>2</sub> cosolvent (M3, M5-2 and M6 samples). Furthermore, considering the concentration (% w/w) of the key essential oil components, samples obtained with ethanol as CO<sub>2</sub> cosolvent also seemed to be those with lower essential oil content (M4, M5-2 and M6 samples). In the case of samples M5-2 and M6, the low content of essential oil compounds could be attributed to the fact that, in both experiments, the plant matrix was previously extracted with pure CO<sub>2</sub> and thus, essential oil substances were almost exhausted. On the other side, the high yield obtained in Extraction 4 (13.44 %) supposes a high co-extraction of other substances and thus, the concentration of both carnosic acid and volatile oil compounds was considerably reduced.

**Table 3.** Normalized (% peak area) composition of key volatile compounds identified in rosemary supercritical extracts <sup>a</sup>.

Ext	Sample	1,8 cineole	Camphor	Borneol	Verbenone	Bornyl acetate
1	M1	66.75	22.83	8.45	n.d. <sup>b</sup>	1.97
2	M2-1	64.43	23.96	5.78	4.14	1.69
3	M2-2	48.28	32.29	10.44	7.27	1.71
3	M3	54.82	28.12	8.62	6.20	2.25
4	M4	56.23	27.95	9.44	6.38	n.d.
5	M5-1	58.40	19.62	6.75	9.20	1.15
5	M5-2	59.98	24.56	9.54	5.92	n.d.
6	M6	61.23	24.01	14.76	n.d.	n.d.

<sup>a</sup> deviations between two injections < 0.08%<sup>b</sup> n.d. = not detected

As expected, due to the fractionation procedure accomplished in Extraction 2, the extract collected in S1 (M2-1) seemed to contain higher amounts of carnosic acid and lower amounts of volatile oil compounds than the sample collected in S2 (M2-2). Further, in comparison with the extract obtained without fractionation (Extraction 1), M2-1 sample seemed to contain higher amounts of carnosic acid than M1 and both samples contained similar amounts of volatile oil components. Nevertheless, extraction yield seemed to be lower in the case of the M2-1, i.e. the sample with higher carnosic acid content.

Based on the SFE assays carried out in this work, higher amounts of antioxidants (e.g. carnosic acid) might be obtained only when a polar co-solvent (ethanol) is employed in the supercritical CO<sub>2</sub> extraction procedure. At this respect, if no ethanol is utilized, fractionation of the extract might improve the antioxidant activity of one of the fractions collected, but process yield might be noticeably reduced.

The rosemary supercritical samples selected to carry out the oxidative stability test were M1, M2-1 and M6. M1 and M2-1 were selected since both samples were produced without using ethanol as cosolvent. This is an important factor to be considered to evaluate a commercial rosemary supercritical extract production, since

evaporation of cosolvent is an expensive task to be accomplished. As mentioned before, M2-1 seemed to contain larger amounts of carnosic acid but extraction yield was reduced from 4.42 % to 2.83 %.

From samples produced using ethanol as CO<sub>2</sub> cosolvent, M6 was selected since it was the sample that seemed to contain the highest carnosic acid content and lower key volatiles content. Furthermore, it should be considered that this sample was produced by the extraction of the same plant matrix utilized in Extraction 1. That is, Extraction 6 (15 MPa, 40°C, and 10 % cosolvent) was accomplished after Extraction 1 (30 MPa, 40°C, and no cosolvent) and two extracts were obtained from the same amount of plant matrix processed, one with 4.52 % yield and 10.89 % w/w carnosic acid, and the other with 4.93 % yield and 30.69 % w/w carnosic acid.

Table 4 shows the EC<sub>50</sub> value determined for samples M1, M2-1 and M6, using the DPPH test. As expected, the EC<sub>50</sub> value tended to decrease as carnosic acid content increased. That is, the antioxidant power of the samples tended to increase with the increasing content of the main antioxidant substance (carnosic acid) present in the extracts. Also given in this table are the carnosic acid + carnosol content (% w/w) and the ratio antioxidant / key volatiles. As can be observed from the table, M6 extract satisfied Directive 2010/67/EU to authorize it as a food additive: carnosic acid + carnosol content greater than 13 % w/w and the ratio antioxidants / key volatile compounds greater than 15. With respect to samples M1 and M2-1, it is clear that the main problem is related with the high content of volatile oil compounds. That is, a deodorization process should be accomplished to these samples in order to reduce the key volatile oil content and then satisfy Directive 2010/67/EU requirements. Indeed, the low content of volatile oil attained in M6 is a consequence of the previous SFE step (Extraction 1) carried out over the same plant matrix.

**Table 4.** EC<sub>50</sub> values, carnosic acid + carnosol content (% w/w) and antioxidants / key volatiles ratio obtained for supercritical rosemary samples M1, M2-1 and M6.

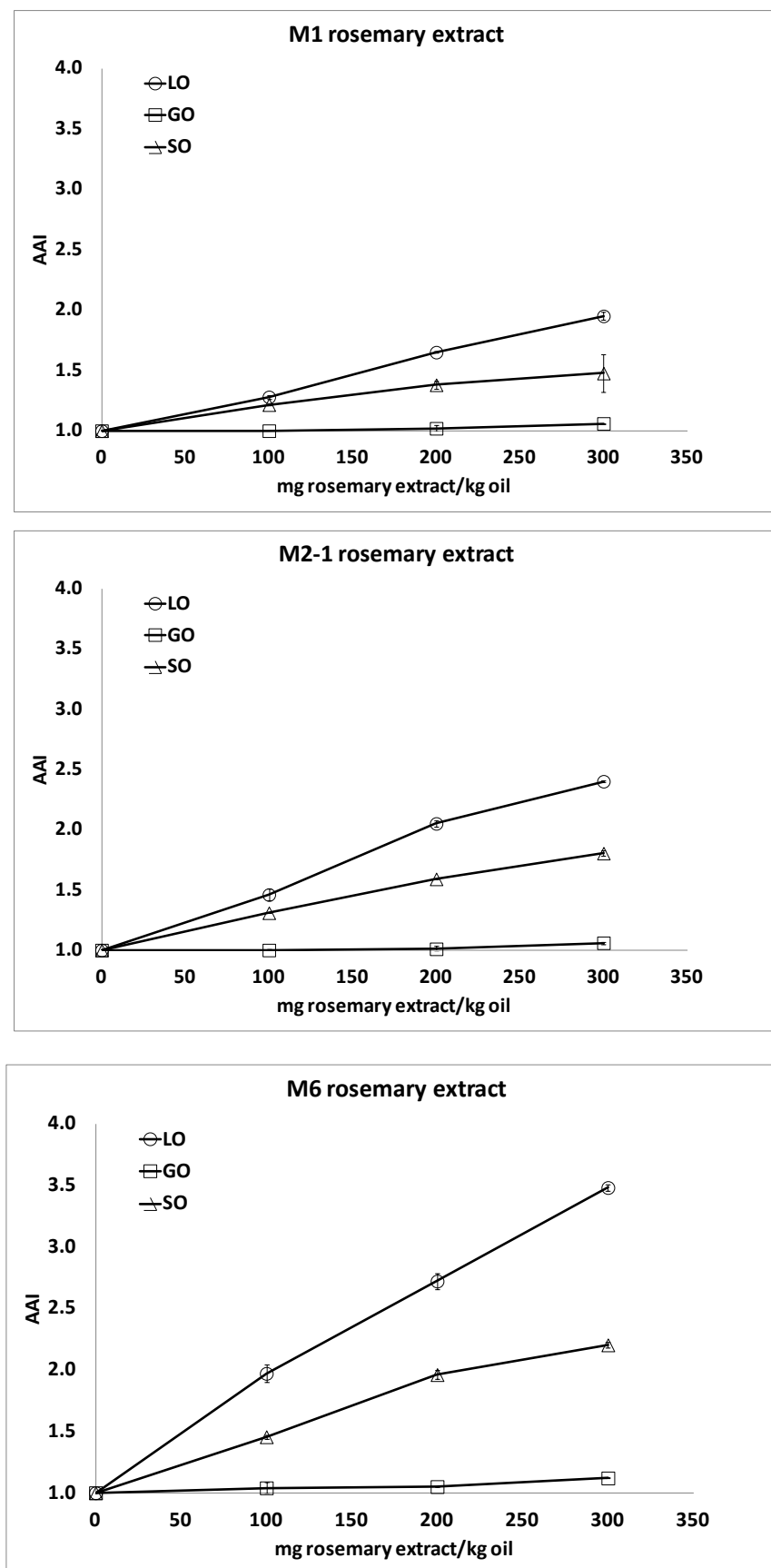
Rosemary extract	EC <sub>50</sub> value <sup>a</sup> (µg/ml)	carnosic acid + carnosol (% w/w)	antioxidants / key volátiles ratio
M1	32.97	11.94	0.93
M2-1	15.91	18.80	1.38
M6	9.8	33.25	16.29

<sup>a</sup> values reported correspond to average value between duplicates; mean standard deviation < 1.1

### 3.3. Antioxidant activity by Rancimat test

The antioxidant activity index (AAI) of selected rosemary supercritical extracts M1, M2-1 and M6 added to LO, GO and SO is shown in Fig. 1 as a function of the amount of extract added to the oil (mg rosemary extract / kg oil). In general, the higher the level of addition of rosemary extract the higher the AAI, regardless of the specific extract and the vegetable oil oxidized [ $p(\text{concentration})=0.026$ ]. Nevertheless, the magnitude of such AAI was different depending on the specific rosemary extract [ $p(\text{extract})=0.019$ ].

A general trend was evidenced as increasing antioxidant activity in the following order: M1 < M2-1 < M6. In order to find a relationship of this result with the composition of the extracts, the AAI values for each individual extract at all assayed concentrations (100, 200 and 300 mg/kg) and for the three oils were considered all together and an average AAI was estimated. Such value was plotted against the specific level of carnosic acid plus carnosol content of each individual extract (Fig. 2).



**Fig. 1.** Antioxidant activity index of selected rosemary extracts added at increasing concentrations to different vegetable oils and oxidized under Rancimat conditions.

As it can be observed, a strong linear correlation was found ( $r^2=0.9999$ ), which suggested that the antioxidant power of each extract in vegetable oils was determined by the specific content of carnosic acid plus carnosol content of the extracts, regardless of the level of addition of the extracts within the oils and regardless of the specific vegetable oil assayed. Therefore, the process of production of the M6 extract by the applied supercritical fluid conditions, which gave the rosemary extract with the highest concentration of antioxidant compounds, was reflected in the highest prolongation of the induction time of lipid oxidation of the assayed vegetable oils. At this respect, it should be noted that the use of the M6 extract would allow reaching the same antioxidant effect, but at lower concentrations, than the M1 and M2-1 extracts. As example, for reaching an AAI of around 2.0 for LO, 100 mg/kg of M6 rosemary extract would be necessary, compared to 200 mg/kg for the M2-1 extract or 300 mg/kg for the M1 extract (Fig. 1). In fact, 100 mg/kg of M6, 200 mg/kg of M2-1 and 300 mg/kg of M1 represent the addition of ca. 35 mg of carnosic acid plus carnosol per kg of oil, which showed again that the antioxidant effect of a specific rosemary extract was mainly determined by the amount of antioxidant compounds added to the oil.

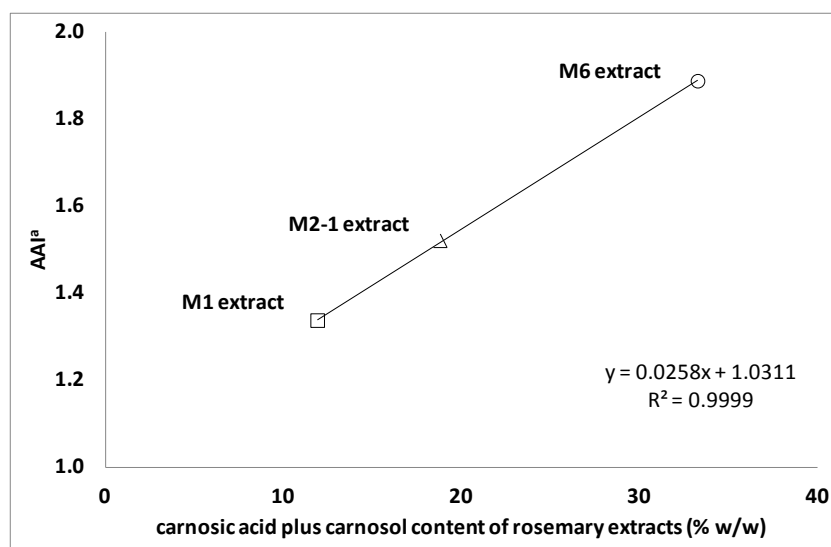
Nevertheless, the amount of extract necessary to produce the desired antioxidant effect is an important factor to take into account for their use as antioxidants in oils, since their level of addition might affect aspects such as the own process of mixing/solubilization of the extract within the oil, or the inclusion of perceptible rosemary-aroma to oils. At this respect, the M6 extract showed the additional advantage of contributing with the lowest level of key volatile compounds. Nevertheless, further studies about the impact of this level of volatile compounds on the flavor attributes of oils should be elucidated. Concerning the effect of the rosemary extracts on the individual vegetable oils, interesting differences between oils were observed.

Previously, it should be mentioned the different initial oxidative susceptibility of the evaluated oils in absence of any added antioxidant, the LO being the most labile, followed by GO, and the SO being the most stable vegetable oil (Table 1). It is frequently assumed that the oxidative susceptibility of lipids is higher as the proportion of PUFA increases (Kim y col., 2008). Such effect was effectively observed



in the present study since according to Table 1, the ratio PUFA/SAT of oils (LO>GO>SO) was in agreement with their initial oxidative stabilities (LO<GO<SO) in absence of rosemary extracts. However, this dependence of the oil oxidative susceptibility and fatty acid composition did not stand when the oil was oxidized in the presence of rosemary extracts. Thus, Tukey's posthoc test showed that the best protection against oxidation was evidence in the case of the most labile oil (LO), whereas an intermediate AAI was obtained for the most stable oil (SO) and the poorest antioxidant effect was observed for the medium stable oil (GO), regardless of the specific rosemary extract and the assayed concentration [ $p(\text{oil}) < 0.001$ ] (Fig. 1). The specific composition in n-3 or n-6 PUFA more than the absolute level of double bonds might determine the particular oxidation of oils when rosemary extract was present. According to Table 1, LO mainly consisted of n-3 linolenic acid (53%) and lower levels of n-6 linoleic acid (19%), whereas n-6 linoleic acid was the major fatty acid of GO (68%) and was also important in SO (44%). Such increasing level of n-6 linoleic acid of oils as LO<SO<GO was found to be linearly correlated ( $r^2 = 0.9984$ ) with the decreasing protective effect of rosemary extract as LO>SO>GO; whereas the level of n-3 linolenic acid did not seem to be responsible of such trend ( $r^2=0.7404$ ).

This result might suggest a limited antioxidant effect of rosemary extracts as the level of n-6 PUFA increased in oils, and it seemed that higher levels of addition would be necessary for evidencing a protective effect (Fig. 1). At this respect, Visioli et al. (1998) concluded that the generation of oxidation products is not only related to the degree of unsaturation but also to the position of the double bonds. This statement was done when the oxidation of eicosapentaenoic acid (C20:5 n-3) and arachidonic acid (C20:4 n-6) was compared, and lower level of oxidation compounds were found for the former, despite its higher number of double bonds and, in turn, its higher expected oxidation. It might be reasonable to think that such implication of the location of double bounds in lipid oxidation might be also related to the easily of antioxidant compounds to exert their protective effect depending on the location of double bonds. However, previous information about the antioxidant effect of rosemary extracts in oils as affected by the location of double bonds in fatty acids has not been found, so further studies at this respect would be of interest to explain the observed effects.



<sup>a</sup> Average value at all the assayed concentrations and for the three oils

**Fig. 2.** Antioxidant power of supercritical rosemary extracts versus their antioxidant compounds (carnosic acid + carnosol) content.

On the other hand, the effect of the own endogenous antioxidants of the vegetable oils should be also involved in the particular differences found between oils when oxidized in presence of exogenous rosemary extracts. Constituents such as  $\gamma$ -tocopherol, lignans and sterols in LO or SO, or  $\alpha$ -tocopherol and phenolic compounds in GO, have been pointed out as important antioxidants of these oils (Lee y col., 2012; Schwartz y col., 2008). Moreover, the interaction between endogenous antioxidant compounds of oils and those of rosemary extracts has been described by diverse authors, which might affect the potential activity of rosemary extracts, mainly by synergic effect in most cases <sup>25,18</sup>. Such effects were not approached in the current assay in which the comparative ability of selected rosemary extracts as technological antioxidants of edible oils was the main aim. Nevertheless, further studies at this respect would be of interest, especially in the case of oils in which the assayed levels of rosemary extracts did not seem to be useful, such as GO.

## Conclusions

Supercritical rosemary extracts were produced employing different extraction and fractionation conditions. Fractionation of the extract improved the antioxidant activity of one of the fractions collected, although process yield is reduced. Moreover, higher amounts of antioxidants seemed to be obtained when ethanol was employed as cosolvent.

The higher the reached content of antioxidants in the supercritical extracts the higher the antioxidant power in LO, GO and SO. Nevertheless, the magnitude of the protective effect was different depending on the individual oils. Indeed, the self-stability of the oil should influence the antioxidant effect of rosemary extract additives. In this respect, when rosemary extracts were added to the oil samples, the best successful protection was found for LO, that is for the most unstable oil. However, in the presence of supercritical rosemary extracts, higher antioxidant activity was found for SO than for GO, despite the fact that GO has a self-induction time almost three times lower than SO. This behavior was explained in our work in terms of the fatty acid composition of the different oils, and a possible limited antioxidant effect of supercritical rosemary extracts on n-6 PUFA, together with potential interactions with the own natural antioxidant compounds of the different oils. Nevertheless, this conclusion could not be generalized on the basis of the present study, and the potential use of supercritical rosemary extracts as antioxidants in vegetable oils should be tested for each particular application.

## Acknowledges

This work has been financed by project AGL2010-21565 (subprogram ALI) and project INNSAMED IPT-300000-2010-34 (subprogram INNPACTO) from Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain) and Comunidad Autónoma de Madrid (project ALIBIRD-S2009/AGR-1469).

### 5.2.3 Supercritical rosemary extracts, their antioxidant activity and effect on hepatic tumor progression

**Gonzalo Vicente**, Susana Molina, Margarita González-Vallinas, Mónica R. García-Risco, Tiziana Fornari, Guillermo Reglero and Ana Ramírez de Molina

*Journal of Supercritical Fluids (2012) Aceptado y en prensa.*

#### **Abstract**

The use of supercritical fluid technology as an innovative technology to extract bioactive compounds has grown considerably in recent decades. Particularly, the recovery of antioxidants from different herbs is a matter of continuous research and development. Antioxidants can protect cells against the effects of free radicals and thus, play an important role in heart illness, cancer and other diseases.

Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) has been recognized as one of the Lamiaceae plant with many important biological activities. Particularly, large antioxidant power has been recognized in rosemary and main substances related with this activity were the phenolic diterpenes such as carnosol, rosmanol, carnosic acid, methyl carnosate, and phenolic acids such as the rosmarinic and caffeic acids. Moreover, carnosic acid and carnosol are recognized as the most abundant antioxidants present in rosemary.

In this work, supercritical fluid technology was applied to produce rosemary extracts with different composition and thus, with different bioactivity properties. Selected extracts, from the variety of samples obtained, were used to study the capability of rosemary supercritical extracts to inhibit the proliferation of human liver carcinoma cells. These extracts showed a dose-dependent effect on inhibiting the proliferation of human hepatoma cells. Moreover, observed citoestaticity appeared to be significantly influenced by their different composition, suggesting a relevant role of the technology to produce the extracts and the consequently obtained compositions on the potential antitumoral activity of rosemary.

## 1. Introduction

Recent studies reveal that the extracts of many plants and herbs are potential anticancer drugs owing to their capacity to prevent, reverse and/or inhibit certain processes of carcinogenesis before the development of invasive cancer (Lila. 2007; Vainio y Weiderpass. 2006). This effect has been attributed to certain substances present in the vegetal matter, and many scientific studies are currently under development to prove that these substances possess specific functional activities. For example, the catechins of green tea (Zaveri. 2006), resveratrol present in grapes, berries and peanuts (Aggarwal y col., 2004), lycopene of tomato (Giovannucci y col., 2002), ellagic acid which is a natural phenol antioxidant found in numerous fruits and vegetables (Narayanana y col., 1999), have been reported to show the capability to prevent cancer development.

Particularly, rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) is a perennial herb from Lamiaceae family, typical of the Mediterranean region, which has been recognized to have numerous and important biological properties, such as hepatoprotective (Amin y Hamza. 2005), antidiabetic (Bakirel y col., 2008), antioxidant (Aruoma y col., 1996), antiproliferative (Cheung. 2007), antiviral (Aruoma y col., 1996), antimicrobial (Martínez y col., 2009), antinociceptive (Machado y col., 2009) and antidepressant (Yesil-Celkitas y col., 2010), among others. Some of these activities point to a promising beneficial effect of rosemary in controlling cancer development. Accordingly, it has been previously reported that rosemary extracts and their isolated components show inhibitory effects on the growth of breast, liver, prostate, lung and leukemia cancer cells (Yesil-Celkitas y col., 2010) and represses the initiation and promotion of tumorigenesis of melanoma and glioma in animal models (Huang y col., 2005; Huang y col., 2009; Moran y col., 2005). However, the potential synergism among components, as well as the putative mechanism of action by which it exerts this biological activity has not been clearly addressed to date.

One of the most appreciated properties of rosemary extract is its antioxidant capacity, which is related to the presence of antioxidant phenolic substances, such as carnosol, rosmanol, carnosic acid, methyl carnosate, rosmarinic and caffeic acids (Reverchon y De Marco. 2006; Pourmortazavi y Hajimirsadeghi. 2007; Babovic y col., 2010). Moreover, carnosic acid and carnosol are the most abundant antioxidant of

rosemary. Some *in vitro* investigations have shown that carnosic acid has an antioxidant activity three times higher than that of carnosol (Cuvelier y Richard. 1996). Nevertheless, also the contrary conclusion was reported, depending on the method employed to evaluate the antioxidant activity Pérez-Fons y col., 2010).

On the other hand, different authors (Carvalho y col., 2005; Reverchon. 1992) compared rosemary extracts produced by supercritical fluid extraction (SFE) with those obtained using liquid solvents (ethanol and hexane) or hydro-distillation, and demonstrated the superior antioxidant activity of the supercritical extracts.

The SFE of rosemary leaves to produce natural antioxidant extracts has been extensively investigated and reported; the reader is referred to some of the abundant literature available in this respect (Carvalho y col., 2005; Reverchon. 1992; Cavero y col., 2005; Chang y col., 2008; Herrero y col., 2010; García-Risco y col., 2011; Ibañez y col., 1999; Ibañez y col., 2003; Ivanovic y col., 2009). The main advantage of SFE is related to the possibility of fractionation of the extract to separate the essential oil substances from the phenolic compounds. In general, fractionation was accomplished by applying different conditions in two sequential extractions (multi-step fractionation) or by producing a cascade decompression of the extract in two or more separator vessels (on-line fractionation). Further, to increase the concentration of phenolic compounds in the extract and get more antioxidant power, the supercritical CO<sub>2</sub> extraction using small amounts of a polar cosolvent (ethanol) was applied.

Multi-step fractionation arrangement consist in performing a first extraction step at low CO<sub>2</sub> density to extract the most soluble compounds (e.g. the volatile oil) followed by a second extraction step at high CO<sub>2</sub> density to remove the less soluble substances (e.g. antioxidants). Ibañez et al. (1999) employed this fractionation scheme and a low-antioxidant but essential oil rich fraction was obtained in the first step (10 MPa and 40°C, CO<sub>2</sub> density = 630 kg/m<sup>3</sup>) and a high-antioxidant fraction was produced in the second step (40 MPa and 60°C, CO<sub>2</sub> density = 891 kg/m<sup>3</sup>). Ibañez et al. (2003) and Ivanovic et al., (2009) employed similar multi-step fractionation scheme to isolate an antioxidant fraction from rosemary.

On-line fractionation is another fractionation alternative which allows operation of the extraction vessel at the same conditions during the whole extraction time, while several separators in series (normally, no more than two or three) are set

at different temperatures and decreasing pressures. The scope of this operation is to induce the selective precipitation of different compound families as a function of their different saturation conditions in the supercritical solvent. This procedure has been applied with success in the SFE of essential oils as it was well established by Reverchon and coworkers in the 1990s (Reverchon.1992; Reverchon y Della Porta.1996; Reverchon y col., 1995).

Supercritical rosemary extraction and on-line fractionation in a two-step depressurization system was studied by Cavero et al. (2005) using pure CO<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> with ethanol cosolvent; the antioxidant fraction was isolated in the first separator, while the volatile oil was recovered in the second separator. Nevertheless, the authors concluded that for increased CO<sub>2</sub> densities a decrease of carnosic acid recovery was obtained. Further, when using ethanol as cosolvent, the differences in the distribution of carnosic acid between fractions recovered in the first and second separators were smaller, showing a decrease in selectivity.

A different on-line fractionation alternative to improve the isolation and yield of the rosemary antioxidants has been recently presented by the authors (Vicente y col., 2012). The temperature and pressure of the extractor vessel were kept constant (30 MPa and 40°C) during the whole extraction time, but the depressurization procedure was varied with time. At the beginning (first period) on-line fractionation of the extract was accomplished; owing to the lower solubility of the antioxidant compounds in comparison to the essential oil, antioxidants would precipitated in the first separator (S1) while the essential oil would be recovered in the second separator (S2). Nevertheless, after some time, the amount of volatile oil in the plant matrix would be significantly reduced but large amounts of antioxidants would still remain in plant matrix (García-Risco y col., 2011). Then, during the rest of the extraction (second period) the pressure of the first separator is reduced and all substances extracted were recovered in S1 (and mixed with the material recovered there during the first period). The authors (Vicente y col., 2012) varied the time of the first period and determined the optimum in order to maximize antioxidant activity and yield in the fraction collected in S1. In this way, a product was obtained with a 2-fold increase of antioxidants in comparison with a scheme with no fractionation, and with a yield

almost five times higher than that obtained when on-line fractionation is accomplished during the whole extraction time.

In this work, rosemary supercritical extracts with different concentration of antioxidant and volatile oil compounds were produced, using diverse extraction conditions such as pressure, amount of co-solvent (ethanol) and taking advance of the different fractionation procedures reported in the literature and concisely explained above. The antioxidant power of the different samples produced was evaluated by the DPPH test, and some selected supercritical rosemary extracts were employed to study the potential antitumor activity of the extracts when added to liver cancer cells.

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Chemicals and samples**

2, 2- Diphenil-1-pyrcil hydrazyl hydrate (DPPH, 95% purity), Camphor (>97%), Bornyl acetate (95%) and Linalool (>97%) were purchased from Sigma-Aldrich. Carnosic acid ( $\geq 96\%$ ) and Carnosol was purchased from Alexis Biochemical. 1,8 cineole (98%) and Borneol (>99%) were purchased from Fluka. Ethanol and phosphoric acid (85%) were HPLC grade from Panreac. Acetonitrile was HPLC grade from Lab Scan (Dublin, Ireland). CO<sub>2</sub> (N38) was supplied from Air Liquid.

The rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) raw material consisted of dried leaves (water content < 5 % wt) obtained from an herbalist's producer (Murcia, Spain). The sample was ground in a cooled mill. Sample particle size was in the range of 200 and 600  $\mu\text{m}$ .

### **2.2 Supercritical extraction and fractionation schemes**

Extractions were carried out using a supercritical fluid pilot-plant (Thar Technology, Pittsburgh, PA, USA, model SF2000) comprising a 2 L cylinder extraction cell and two different separators (S1 and S2), each of 0.5 L capacity with independent control of temperature ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ) and pressure ( $\pm 1$  bar). The extraction equipment also includes a recirculation system, where CO<sub>2</sub> is condensed, pumped up to the desired extraction pressure and heated up to the selected extraction temperature.



The extraction conditions were planned on the basis of previous studies reported in the literature (Carvalho y col., 2005; Reverchon. 1992; Caverio y col., 2005; Chang y col., 2008; Herrero y col., 2010; García-Risco y col., 2011; Ibañez y col., 1999; Ibañez y col., 2003; Ivanovic y col., 2009; Vicente y col., 2012) with respect to the SFE of rosemary leaves to produce antioxidant fractions. Different fractionation alternatives (described in the Introduction) to improve the concentration of antioxidants were scheduled also according to prior studies.

The differences between the SFE assays carried out in this study are described in detail in Table 1. The temperature of the extraction cell and separators was maintained at 40°C and CO<sub>2</sub> flow rate was 60 g/min in all experimental assays (Extractions 1 to 5 in Table 1). For each experimental assay 0.55 kg of rosemary leaves (ground and sieved to 200-600 µm) were employed. In selected assays (see Table 1) fractionation of the extracted material was accomplished by setting the pressure of the first separator (S1) to 100 bar, while the second separator (S2) was maintained at the recirculation system pressure (50 bar). In this case, two different samples were collected: one sample from S1 and the other from S2. When no fractionation of the extract was accomplished, S1 was set to the recirculation system pressure and thus, only one sample was recovered from S1. The solid fractions obtained in S1 and S2 were recuperated and placed in vials. In order to ensure an accurate determination of extraction yield with time, separators were washed with ethanol and the residual material recovered in each case was mixed with the corresponding solid fraction. Ethanol was eliminated by evaporation (35°C) and then, homogeneous solid samples were obtained and kept under N<sub>2</sub> at -20°C in the dark until analysis.

**Table 1.** Production of supercritical rosemary extracts applying different process conditions. P: extraction pressure; C: % weight cosolvent (ethanol); t: extraction time.

Extraction number	Extraction and fractionation conditions	Samples obtained
1	P = 150 bar, C = 5 % w/w, t = 180 min. No fractionation of the extract.	One sample was collected from S1 separator (M1).
2	P = 150 bar, C = 10 % w/w, t = 180 min. No fractionation of the extract.	One sample was collected from S1 separator (M2).
3	P = 150 bar. First step (t = 60 min): C = 0. Second step (t = 120 min): C = 10 % w/w.	Two samples from the first (M3-1) and second (M3-2) steps.
4	First step: P = 300 bar, t = 360 min. Second step: P = 150 bar; C = 10 % w/w, t = 180 min.	Two samples from the first (M4-1) and second (M4-2) steps.
5	P = 300 bar, fractionation of the extract was accomplished during t = 60 min. Then, extraction continued for t = 300 min without fractionation.	Two samples: one from S1 (M5-1) and the other from S2 (M5-2).

### 2.3 GC-MS analysis

The essential oil compounds of samples were determined by GC-MS-FID using 7890A System (Agilent Technologies, U.S.A.), comprising a split/splitless injector, electronic pressure control, G4513A auto injector, a 5975C triple-Axis mass spectrometer detector, and GC-MS Solution software. The column used was an Agilent 19091S-433 capillary column, 30 m x 0.25 mm I.D. and 0.25  $\mu$ m phase thickness. Helium, 99.996% was used as a carrier gas at a flow of 29.4 ml/min and inlet pressure of 28.823 Psi. Oven temperature programming was 60°C isothermal for 4 min then increased to 106 °C at 2.5 °C/min and from 106°C to 130°C at 1°C/min and finally from 130°C to 250 °C at 20°C/min, this temperature was kept constant for 10 min. Sample injections (1  $\mu$ l) were performed in split mode (1:10). Injector temperature was of 250°C and MS ion source and interface temperatures were 230

and 280°C, respectively. The mass spectrometer was used in TIC mode, and samples were scanned from 40 to 500 amu. Key volatiles were identified by comparison with standard mass spectra, obtained in the same conditions and compared with the mass spectra from library Wiley 229. The rest of compounds were identified by comparison with mass spectra from Wiley 229 library. A calibration curve was employed to quantify each of the key volatiles. GC-MS analyses were carried out by duplicate and the average standard deviation obtained was  $\pm 0.08\%$ .

## 2.1 HPLC analysis

Carnosic acid and carnosol content in the samples were determined using an HPLC (Varian Pro-star) equipped with a Microsorb-100 C<sub>18</sub> column (Varian) of 25 cm  $\times$  4.6 mm and 5  $\mu$ m particle size. The analysis is based on the work of Almela et al (2006). The mobile phase consisted of acetonitrile (solvent A) and 0.1% of phosphoric acid in water (solvent B) applying the following gradient: 0–8 min, 23% A, 8-25 min, 75% A, 25-40 min 75% A and the 40-45 min 23% A. Initial conditions were gained in 5 min. The flow rate was constant at 0.7 ml/min. Injection volume was 20  $\mu$ l and the detection was accomplished by using a diode array detection system (Varian) storing the signal at a wavelength of 230, 280 and 350 nm. Samples were analyzed by HPLC in duplicate and the obtained average standard deviation was  $\pm 0.13\%$ .

## 2.5 Antioxidant activity by the DPPH test

The method consists in the neutralization of free radicals of DPPH by an antioxidant sample (Brand-Williams y col., 1995)]. An aliquot (50  $\mu$ l) of ethanol solution containing 5-30  $\mu$ g/ml of rosemary extract, was added to 1.950  $\mu$ l of DPPH in ethanol (23.5  $\mu$ g/ml) prepared daily. Reaction was completed after 3 h at room temperature and absorbance was measured at 517 nm in a Nanovette Du 730 UV spectrophotometer (Beckman Coulter, USA). The DPPH concentration in the reaction medium was calculated from a calibration curve determined by linear regression ( $y = 0.0265 \cdot x$ ;  $R^2 = 0.9998$ ). Ethanol was used to adjust zero and DPPH-ethanol solution as a reference sample. The amount of extract necessary to decrease the initial DPPH concentration by 50% or EC<sub>50</sub> ( $\mu$ g/ml) was determined and employed to value the

antioxidant power of the sample; the lower the EC<sub>50</sub>, the higher the antioxidant power.

## 2.6 Cell culture

Human hepatoma HepG2 cells, obtained from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA), were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco, Grand Island, NY, USA) and 1% of antibiotic-antimycotic solution (containing 10 000 units/mL of penicillin base, 10 000 µg/mL of streptomycin base, and 25 000 ng/mL of amphotericin B; Gibco). The cells were maintained under standard conditions of temperature (37°C), humidity (95%), and carbon dioxide (5%).

## 2.7 Cell viability assay

The antiproliferative activity of supercritical rosemary extracts was measured by MTT assay. Cells in the exponential growth phase were seeded in 96-well plates using 200 µL of cell suspension at a density of 6000 cells per well, and incubated overnight. Then, the number of viable cells in the control wells was determined by colorimetric assay (described below); immediately afterwards, medium was replaced with new culture medium (blank wells) or supplemented with increasing concentrations of the corresponding rosemary extract. Cell viability was determined after 48 h. In order to determine the number of viable cells, 20 µL of MTT solution (5 mg/mL in PBS) was added to each well and incubated for 3 h; subsequently, the medium was removed and 200 µL of dimethyl sulfoxide (DMSO) was added to lyse the cells and resuspend the formazan (the metabolic product of MTT). Quantities of formazan product, which are directly related to the number of viable cells, were measured at 560 nm using a scanning spectrophotometer microplate reader (UVM 340 Biochrom, Cambridge, UK). At least three independent experiments were performed in triplicate.

## 2.8 Statistical analysis

Experimental supercritical extractions were carried out by duplicate in the SFE system. Standard deviations of extraction yields obtained were calculated as follows:

$$StD = \sqrt{\frac{1}{2} \times [(x_1 - \bar{x})^2 + (x_2 - \bar{x})^2]} \quad (1)$$

Being  $x_1$  and  $x_2$  the values obtained in each of the experiments and  $\bar{x}$  the corresponding average value.

Quantification of carnosic acid and main volatile oil compounds together with the antioxidant activity tests were also carried out by duplicate, employing the mixture of extracts obtained in the duplicate extraction assays. Equation (1) was applied in order to test the reproducibility of the data obtained.

Cell viability assays were carried out in quadruplicate, and two independent experiments were performed with each selected rosemary extract. Concentration values corresponding to cell sensitivity (IC50), growth inhibition (GI50) and cytostaticity (TGI) were calculated according to the NIH definitions using a logistic regression. These parameters, as well as the ratio of viable cells, were expressed as mean  $\pm$  s.e.m., which was calculated as follows:

$$s.e.m = \frac{StD}{\sqrt{n}} \quad \text{being } n \text{ the number of independent experiments performed.}$$

Comparisons between groups were done using the non-parametric Man-Whitney test. Two side p-values less than 0.05 were considered statistically significant. All calculations were performed using SPSS software, version 19.0 (SPSS Inc, Chicago, Illinois).

## 3. Results and discussion

### 3.1. Supercritical rosemary extracts

The different conditions applied in the rosemary supercritical extractions (Table 1) were target to produce samples with different content of antioxidant substances and volatile oil compounds, with the intention of detecting a relation between the composition of the extract and its effect on liver cancer cells.

Table 2 shows the extraction yield, the carnosic acid content and the total content (% w/w) of the most abundant volatile compounds (borneol, bornyl acetate, camphor, 1,8-cineol and verbenone) of the supercritical rosemary extracts produced in Extractions 1 to 5 defined in Table 1. Low amounts of carnosol (< 3 % w/w) were obtained in all samples collected. Additionally, the normalized composition (% peak area) of the main volatile oil compounds was determined and is given in Table 3.

As can be observed from Table 2, the higher carnosic acid contents were obtained when ethanol was employed as CO<sub>2</sub> cosolvent (M1, M3-2 and M4-2 samples). Additionally, a low content of essential oil compounds were determined in samples M3-2 and M4-2, what could be attributed to the fact that, in both experiments, the plant matrix was previously extracted with pure CO<sub>2</sub> and thus, essential oil substances were almost exhausted.

Lower % w/w of carnosic acid was obtained in M2 than in M1 demonstrating a decrease of selectivity of the process when high amounts of a polar cosolvent is employed. That is, the high yield obtained in Extraction 2 (10% w/w cosolvent) supposes a high co-extraction of substances other than antioxidants or essential oil. Thus, the concentrations of both carnosic acid and volatile oil compounds obtained in M2 sample (10% w/w ethanol) were considerably reduced with respect to M1 sample, which was produced at identical extraction conditions but using lower percentages of cosolvent (5% w/w cosolvent).

As expected, due to the fractionation procedure accomplished in Extraction 5 (no cosolvent was employed) the extract collected in S1 (M5-1) contains higher amounts of carnosic acid and lower amounts of volatile oil compounds than the sample collected in S2 (M5-2). Nevertheless, lower extraction yield was obtained for M5-1 fraction in comparison to the samples obtained using ethanol as cosolvent.

**Table 2.** Extraction yield, carnosic acid and main volatile oil compounds content (% w/w) in the supercritical rosemary samples produced.

Ext.	Sample	Yield (g extract / g rosemary leaves x 100) <sup>a</sup>	Carnosic acid <sup>b</sup> (% w/w)	Main volatiles compounds <sup>c</sup> (% w/w)
1	M1	7.26	25.66	10.42
2	M2	13.44	14.18	4.69
3	M3-1	1.42	2.00	36.92
	M3-2	3.02	28.49	4.81
4	M4-1	4.52	10.89	12.79
	M4-2	4.93	30.69	2.04
5	M5-1	2.83	16.90	13.59
	M5-2	1.53	3.12	21.70

<sup>a</sup> mean standard deviation < 0.24<sup>b</sup> values reported correspond to average value between duplicates; mean standard deviation < 0.53<sup>c</sup> values reported correspond to average value between duplicates; mean standard deviation < 0.41

Based on the SFE assays carried out in this work, it can be concluded that high amounts of antioxidants (e.g. carnosic acid) might be obtained only when a polar co-solvent (ethanol) is employed in the supercritical CO<sub>2</sub> extraction procedure. Further, is more convenient the use of low percentages of ethanol cosolvent ( $\approx$  5% w/w) to produce a supercritical rosemary extract with high concentration of antioxidants. At this respect, if no ethanol is utilized, fractionation of the extract can improve the antioxidant activity of one of the fractions collected, but process yield might be noticeably reduced.

Analysis of the essential oil composition (Table 3) show that despite the concentration of essential oil obtained in the extracts, the composition of the essential oil recovered is quite similar, being 1,8 Cineole and Camphor the more abundant key volatiles present in rosemary essential oil.

**Table 3.** Normalized (% peak area) composition<sup>a</sup> of main volatile oil compounds identified in rosemary supercritical extracts.

Ext	Sample	1,8 cineole	Camphor	Borneol	Verbenone	Bornyl acetate
1	M1	54.82	28.12	8.62	6.20	2.25
2	M2	56.23	27.95	9.44	6.38	n.d.
3	M3-1	58.40	19.62	6.75	9.20	1.15
	M3-2	59.98	24.56	9.54	5.92	n.d.
4	M4-1	66.75	22.83	8.45	n.d. <sup>b</sup>	1.97
	M4-2	61.23	24.01	14.76	n.d.	n.d.
5	M5-1	64.43	23.96	5.78	4.14	1.69
	M5-2	48.28	32.29	10.44	7.27	1.71

<sup>a</sup> deviations between two injections < 0.08%

<sup>b</sup> n.d. = not detected

The rosemary supercritical samples selected to carry out the studies about their antitumor effect on liver cancer cells were M4-1, M5-1, M1 and M4-2. Moreover, all samples contain similar amounts of key volatile oil compounds (around 12 % w/w), except M4-2 which contains a significant reduced amount of volatile oil compounds (2 % w/w). Figure 1 show a comparison between the GC chromatogram obtained for samples M5-1 and M4-2. Particularly, M4-1 and M5-1 were selected since both samples were produced without using ethanol as cosolvent. This is an important factor to be considered to evaluate the commercial production of the extract, since evaporation of cosolvent is an expensive task to be accomplished.

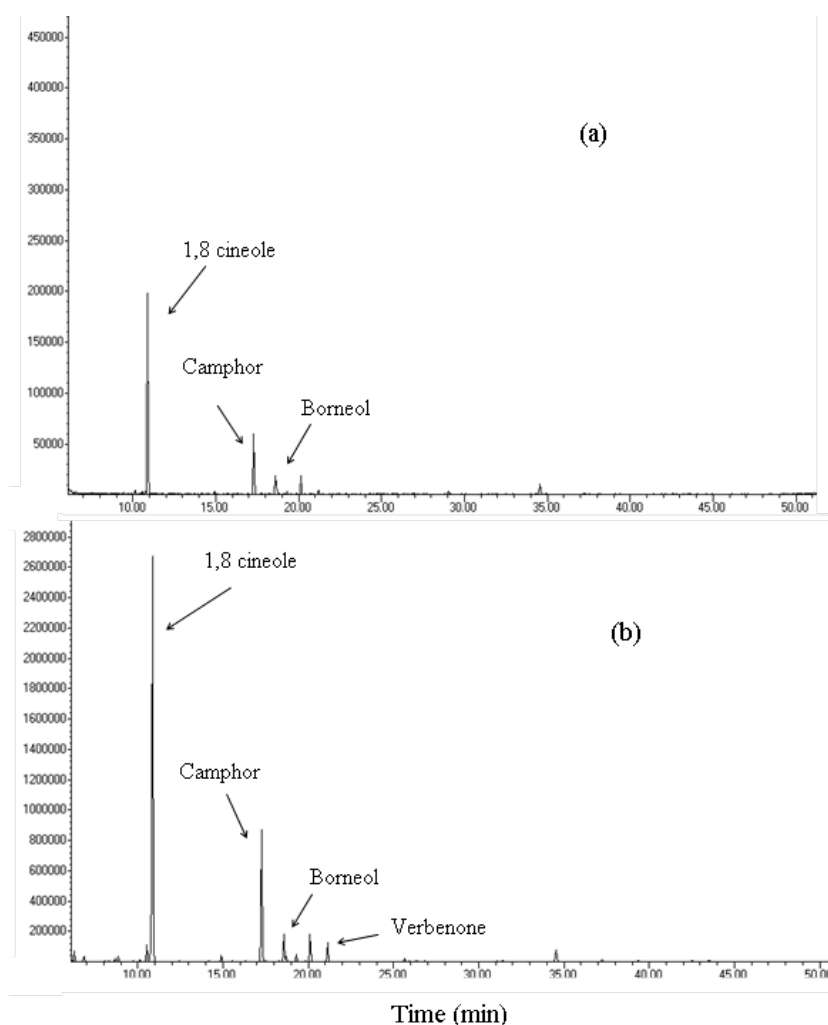
Table 4 shows the EC<sub>50</sub> value determined for the selected samples using the DPPH test. As expected, the EC<sub>50</sub> value decreased (and the antioxidant power of the samples increased) as the content of carnosic acid antioxidant increased. Also given in Table 4 is the carnosic acid / key volatiles ratio; as mentioned before while M4-1, M5-1 and M1 contain ratios close to 1-2, while sample M4-2 was almost completely deodorized (carnosic acid / key volatiles ratio = 15).



**Table 4.** EC<sub>50</sub> values and content of carnosic acid (% w/w) of selected supercritical rosemary samples produced in this work.

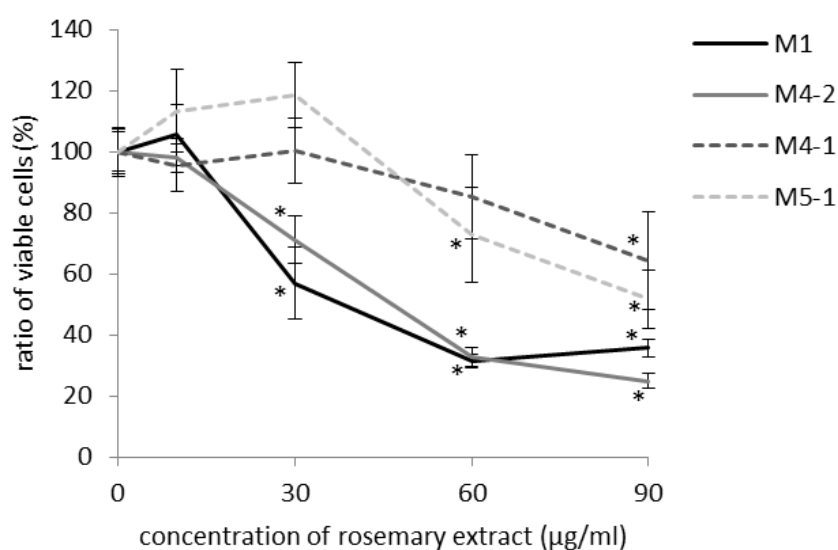
Rosemary extract	EC <sub>50</sub> value <sup>a</sup> (µg/ml)	carnosic acid (% w/w)	carnosic acid / volatile oil ratio
M4-1	32.97	10.89	0.85
M5-1	15.91	16.90	1.24
M1	14.77	25.66	2.46
M4-2	9.8	30.69	15.04

<sup>a</sup> values reported correspond to average value between duplicates; mean standard deviation < 1.1

**Fig. 1.** Comparison between the GC chromatogram obtained for (a) M4-2 and (b) M5-1 supercritical rosemary extracts.

### 3.3. Differential effect of supercritical rosemary extracts on the inhibition of the proliferation of human hepatoma cells.

Despite the reported hepatoprotective activity of rosemary (Amin y Hamza. 2005) its potential activity against liver tumor progression has not been described yet. Thus, in order to address this issue, and to examine the potential effect of the different selected rosemary supercritical extracts (M4-1, M5-1, M1 and M4-2 samples), cell proliferation was analyzed by MTT assay in human hepatoma cancer cells after treatment with increasing concentrations (from 0 to 120  $\mu\text{g/mL}$ ) of the different compositions of extracts for 48 h. As it can be observed in Figure 2, each supercritical rosemary extract exhibited a significant dose-dependent effect on cell proliferation. Furthermore, those extracts with the highest content of carnosic acid, M1 and M4-2, are significantly more active against human hepatoma cells than those with the lowest content of this compound, M4-2 and M5-1 (Figure 2).



**Figure 2.** Supercritical rosemary extracts inhibit the proliferation of human hepatoma cells in a dose-dependent manner. Dose-dependent effect of selected rosemary extracts on inhibiting the proliferation of human hepatoma cells. Values represent the mean  $\pm$  s.e.m. of two independent experiments each performed in quadruplicate. Asterisks indicate statistically different values in treated cells respect to control.

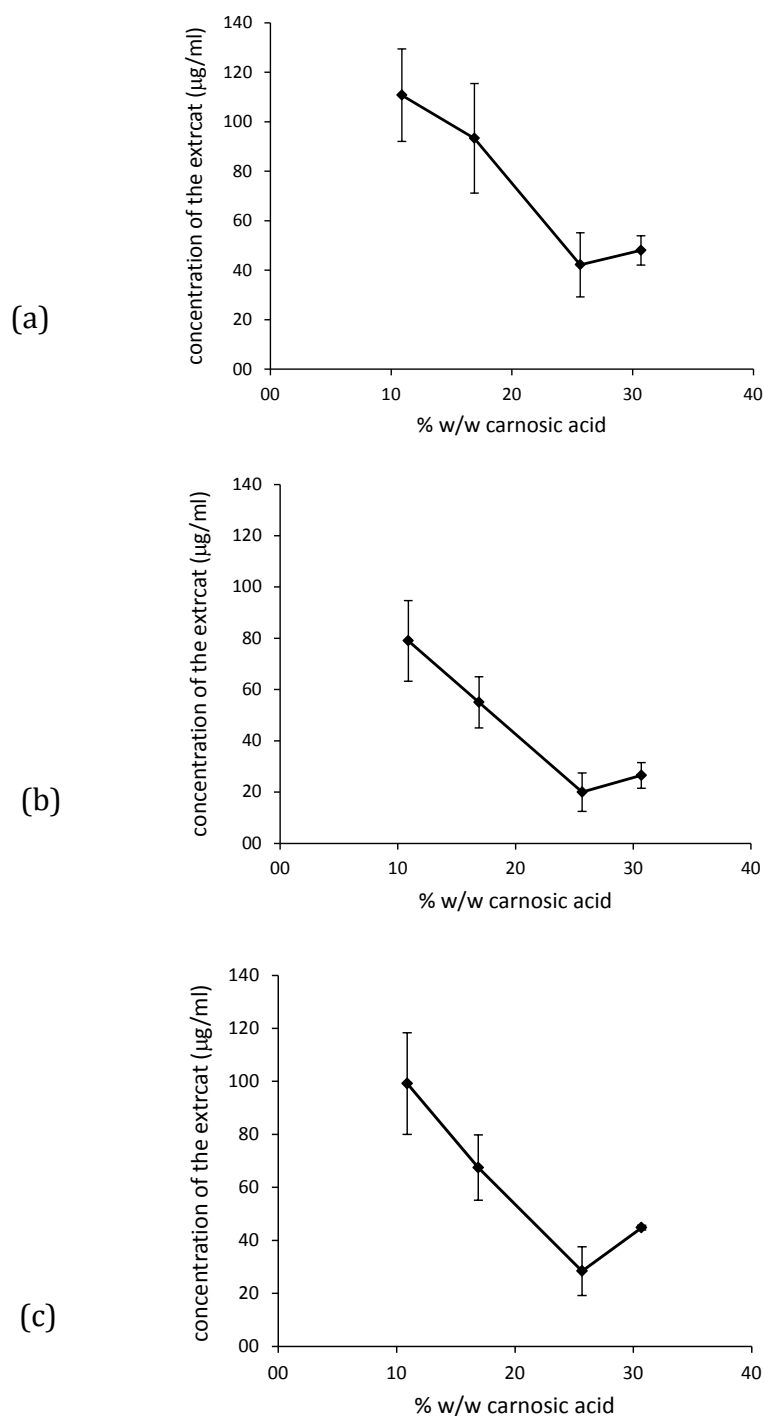
In addition, values representing cell sensitivity to the extracts (IC<sub>50</sub>), growth inhibition (GI<sub>50</sub>) and cytostaticity (TGI) were determined (Table 5). The variation of these parameters with the % w/w of carnosic acid of the sample is depicted in Figure 3. As it can be observed in the individual graphs, a considerably reduction of the proliferative activity of the cells is observed for increasing amounts of carnosic acid from M4-1 to M1 samples, in accordance with the conclusion attained by Yesil-Celiktas et al. (2010). These authors recently compare the anticarcinogenic activity of soxhlet and supercritical CO<sub>2</sub> extracts of rosemary, as well as their main antioxidant components, carnosic and rosmarinic acid, on the growth of various human cancer cell lines, and including liver carcinoma cells. They concluded that the findings confirm the superiority of supercritical CO<sub>2</sub> extraction over solvent extraction yielding higher amounts of active compounds, particularly carnosic acid, which was in turn reflected by the high antiproliferative effects.

That is, the higher the concentration of carnosic acid in these samples, the lower the values of IC<sub>50</sub>, GI<sub>50</sub> and TGI. However, although sample M4-2 contains higher concentration of carnosic acid than sample M1 and consecutively presents higher antioxidant activity, M4-2 anti-proliferative effect is not increased with respect to M1, resulting even lower. Accordingly, percentage of human hepatoma viable cells after treatment with the different extracts is comparable and significantly higher for M1 and M4-2 (Figure 2), though M4-2 shows a 50% increased antioxidant activity. Furthermore, though to a lower extent, the biological activity found for M4-1 and M5-1 is also comparable (Figure 2), whereas antioxidant activity is two-fold higher for M5-1, reaching levels even close to that of M1 (Table 4). Thus, these results suggest that the potential antitumoral activity of rosemary extracts against human hepatoma cells is not related to their antioxidant activity, but it is to the extract composition which is determined by the extraction procedure employed.

**Table 5.** Cell sensitivity (IC<sub>50</sub>), growth inhibition 50 (GI<sub>50</sub>), and tumor growth inhibition (TGI), indicative of the required concentration to induce a cytostatic effect of HepG2 cells after 48 h treatment with the different extracts (μg/mL).

	M4-1	M5-1	M1	M4-2
% carnosic acid	10.89	16.90	25.66	30.69
IC <sub>50</sub>	110.71 ± 18.7	93.26 ± 22.1	42.16 ± 5.9	48.01 ± 3.2
GI <sub>50</sub>	78.98 ± 15.7	55.00 ± 10.0	20.00 ± 5.0	26.50 ± 6.5
TGI	99.18 ± 19.2	67.47 ± 12.3	28.40 ± 0.9	44.80 ± 6.0

In this sense, though comparable range of antiproliferative effect is observed for M1 and M4-2, the most active extract in abrogating liver tumoral cell growth is M1 (Table 5), containing around 12% w/w of volatile oil compounds whereas M4-2 contain only ca. 2%w/w (Table 2). Thus, these results suggest that reaching a significant content of carnosic acid, the presence of volatile oil compounds do not interfere with its antitumoral activity, but by contrast, might synergize in this effect.



**Figure 3.** IC50 (a), GI50 (b) and TGI (c) as a function of the carnosic acid content (% w/w) of the different extracts tested. Cell sensitivity and cytoestaticity determined as IC50 (a), GI50 (b) and TGI (c) of the different supercritical rosemary extracts on human hepatoma cells is represented as a function of their carnosic acid content (% w/w). Results are shown as the mean  $\pm$  s.e.m. of two independent experiments each performed in quadruplicate.

## Conclusions

Supercritical rosemary extracts were produced employing different extraction and fractionation conditions. Fractionation of the extract improved the antioxidant activity of one of the fractions collected, although process yield was reduced. Moreover, the higher amounts of antioxidants were obtained only when ethanol was employed as cosolvent.

Supercritical rosemary extracts with different content of antioxidants (carnosic acid) and essential oil compounds were investigated on their effect to inhibit the proliferation of human liver carcinoma cells. Rosemary abrogates the growth of human hepatoma cells. In addition, a considerably reduction of the proliferative activity of the cells is observed for increasing amounts of carnosic acid in the samples. However, although the concentration of carnosic acid demonstrated to have a crucial effect on growth inhibition and cytostaticity, the putative antitumoral activity of supercritical rosemary extracts might not be exclusively attributed to carnosic acid antioxidant content. Thus, substances comprising the volatile oil fraction might synergize with rosemary in its antitumoral action. These results suggest that M1 might constitute an efficient composition to further analyze its effects as an antitumoral agent against liver cancer, and additional studies will be developed on this direction.

## Acknowledges

This work has been financed by project AGL2010-21565 (subprogram ALI), RyC 2008-03734, and project INNSAMED IPT-300000-2010-34 (subprogram INNPACTO) from Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain), Comunidad Autónoma de Madrid (project ALIBIRD-S2009/AGR-1469) and European Union Structural Funds.

## 5.3 Concentración de compuestos bioactivos mediante Cromatografía Supercrítica

### 5.3.1 Prefacio

Mediante la extracción supercrítica con y sin co-solvente (etanol) y los esquemas de fraccionamiento estudiados en los apartados anteriores, se han obtenido extractos de romero con rendimientos entre 4 y 13 % y concentraciones de ácido carnósico entre 18 y 32 %. Las aplicaciones que se realizaron de los extractos, sección 5.2., han puesto de manifiesto que el ácido carnósico, hasta una determinada concentración, parece ser el principal responsable de estas actividades biológicas. Por ello se planteó como siguiente objetivo producir un extracto con concentraciones más elevadas de este compuesto de las que se habían obtenido exclusivamente con la extracción supercrítica. Para ello se empleó la cromatografía con fluidos supercríticos en modo semi-preparativo con el objetivo de purificar el extracto de romero y obtener una fracción enriquecida en el compuesto de interés.

El primero de los trabajos que se presenta en esta sección "*Fractionation of thyme (Thymus vulgaris L.) by supercritical fluid extraction and chromatography*" se realizó con el objetivo de conocer las capacidades, reproducibilidad y posibilidad de escalado del equipo disponible (SFC, Thar Investigator II, Figura 4.3). Las primeras pruebas se llevaron a cabo con un extracto supercrítico de tomillo, y se estudió el efecto de la presión, temperatura, flujo de CO<sub>2</sub> y porcentaje de co-solvente (etanol), en la polaridad de la fase móvil, sobre la elución de un patrón de timol, compuesto antimicrobiano mayoritario del aceite esencial de tomillo y en este caso, del extracto supercrítico de tomillo. Una vez comprobados los efectos de las distintas variables, se realizó el escalado del proceso a modo semi-preparativo, aumentando en cinco veces la capacidad de carga de la columna y en cuatro veces la concentración de la muestra. En cada uno de los análisis se recogieron 3 fracciones, atendiendo a los tiempos de retención de los compuestos, con objeto de purificar o concentrar el timol en una de las fracciones. Además, para garantizar una recuperación cuantitativa de las fracciones producidas, y poder analizar los resultados, se llevaron a cabo hasta 50 inyecciones sucesivas en el sistema cromatográfico. En estas condiciones se consiguió una recuperación de un 95% de la muestra inicial inyectada, como suma de la masa

de las tres fracciones, y se optimizaron las variables del proceso de separación hasta obtener una fracción con el doble de concentración de timol que el extracto supercrítico inicial.

En el segundo de los trabajos que se presentan en esta sección "*Supercritical CO<sub>2</sub> chromatography isolation of carnosic acid from rosemary extracts*", una vez conocida la capacidad del equipo SFC, se planteó el aislamiento de ácido carnósico a partir de los extractos supercríticos de romero. En este trabajo se realizaron en primer lugar estudios sobre la elución del ácido carnósico patrón a diferentes presiones, temperaturas y diferentes porcentajes de co-solvente (etanol). En segundo lugar, una vez observado el efecto de los diferentes parámetros en el análisis del compuesto patrón, se procedió al análisis de los extractos de romero obtenidos según se describe en la sección anterior. Para mejorar la separación cromatográfica, fue necesario el estudio de diferentes columnas cromatográficas comerciales para modificar la polaridad de la fase estacionaria y conseguir una buena separación de los picos cromatográficos para el posterior escalado y fraccionamiento de los extractos. En esta etapa se probó el efecto de presiones entre 10 y 20 MPa, temperaturas entre 40 y 60 °C, porcentajes de etanol entre 5 y 20 % y columnas del mismo tamaño de partícula, diámetro y longitud con rellenos de sílice y diol, empaquetadas para ser utilizadas en HPLC y columnas de sílice y 2-etilpiridina, empaquetadas especialmente para ser utilizadas con fluidos supercríticos, manteniendo en todos los casos el flujo de CO<sub>2</sub> constante. Se realizaron también pruebas de reproducibilidad de las columnas seleccionadas por ofrecer mejor resolución, y se establecieron los intervalos de tiempo para el fraccionamiento del extracto.

Los mejores resultados en la separación se obtuvieron en la columna SFC 2-etilpiridina y, además, a pesar de que fue necesario incrementar el porcentaje de etanol hasta un 20 %, se obtuvo una fracción con una concentración del ácido carnósico de hasta 4 veces superior a la de partida y con una recuperación del extracto inicial de un 95 %. Una de las fracciones obtenida en esta separación presentaba una pureza en ácido carnósico superior al 95 %, comparable con un patrón comercial.



### 5.3.2 Fractionation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) by supercritical fluid extraction and chromatography

Mónica R. García-Risco, **Gonzalo Vicente**, Guillermo Reglero and Tiziana Fornari

*Journal of Supercritical Fluids* 55 (2011) 949–954

#### Abstract

Supercritical fluid chromatography (SFC) was employed to fractionate thyme (*Thymus vulgaris* L.) extracts, which were obtained by supercritical carbon dioxide extraction of thyme leaves. First, different supercritical extracts were produced at 313 K and at different pressures (15, 30 and 40 MPa). Thymol, a monocyclic terpenoid with recognized antiseptic, analgesic and anti-inflammatory properties, was identified and quantified in the different samples by GC-MS. Then, the supercritical extracts were fractionated by semi-preparative SFC, and different conditions such as pressure, temperature and amount of cosolvent (ethanol) employed were studied. Around a two fold increase of thymol was achieved at 15 MPa, 50°C and 3% ethanol cosolvent, recovering 97% of the monocyclic terpenoid extracted.

## 1. Introduction

Supercritical fluid extraction (SFE) using carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) is a promising process to extract valuable compounds from natural plant material, avoiding thermal degradation and the presence of solvent residues in the extracts. SFE extraction of plant material has attained several important industrial applications in the food field, such as the extraction of hops, the removal of caffeine from coffee beans, the recovery of essential oil from plants, etc. New studies are frequently coming out in the literature, reporting original extraction data and extending the SFE applications (Reverchon y De Marco. 2006).

Supercritical one-stage CO<sub>2</sub> extraction, in general, does not allow the selective extraction of the preferred compounds (Reverchon y col., 1994). On-line fractionation of the extract in a cascade decompression system can produce fractions enriched with some class of substances (Simandi y col., 1998). Nevertheless, extracts usually contain a large list of different substances and purification is required in order to isolate the most valuable compounds. In this sense, preparative-scale chromatographic techniques are a useful alternative to separate a complex extract and to concentrate its most valuable compounds.

Supercritical fluid chromatography (SFC) offer interesting advantages compared to liquid chromatography such as faster analysis, recovery of products by simple decompression and lower consumption of organic solvents (Toribio y col., 2003). Particularly, SFE could be on-line coupled with the SFC system and thus, extraction and purification could be achieved in one step. Nevertheless, SFC has the disadvantage in case of separation of polar compounds because of the polarity of the mobile phase employed. This can be solved adding different amounts of modifiers into the mobile phase or tuning the polarity of the stationary phase (Berger. 1995).

*Thymus vulgaris* L. is a botanical species abundantly widespread over Portugal and Spain. Its essential oil is valuable for food flavoring (Prakash. 1990) and in the pharmaceutical (Ferley y col., 1988), cosmetic and perfumery industries (Mookherjee y col., 1989). Particularly, a monocyclic terpenoid namely thymol, has been recognized to have attractive functional activities such as antiseptic, analgesic and anti-inflammatory properties (Priestley y col., 2003).

The SFE of thyme was studied by some authors Zekovic et al. (2000) reported the SFE of *Thymus vulgaris* L. at 313 K and pressures from 80 to 40 MPa. Extracts with the highest thymol content (37.3 % weight) were obtained at 10 MPa and 313 K, with a total extraction yield (mass extracted/thyme load) of 2.1%. Other terpenoids present in the extracts were carvacrol, menthol, camphor and phytol, which were present in quite lower amounts (0.5-7.6 % weight). Additionally, around 40% wt of hydrocarbons were also identified in their extracts. In another contribution, Zekovic et al. (2003) reported the extraction of the same thyme variety using liquid CO<sub>2</sub> (6.5 MPa and 296 K). In this case, the extract composition and yield resulted quite similar to that obtained with supercritical CO<sub>2</sub> at 10 MPa and 313 K.

Moldao-Martins et al. (2000) reported a comprehensive composition of SFE *Thymus zygis* L. extracts. Besides the different variety of thyme extracted, it is important to point out that around 24% of phenols (mainly thymol) were identified, together with 5% of hydrocarbon monoterpenes, 4% of terpenic esters and ca. 63% of heavy compounds including alkanes, waxy esters and carotenoids.

More recently, Díaz-Maroto et al. (2005) compared the *Thymus vulgaris* L. essential oil obtained by SFE and by a simultaneous distillation-extraction (SDE) process. The extracts obtained by SFE showed higher amounts of oxygenated terpenes than those obtained by SDE. Again, thymol was identified as the major terpenoid compound in the SFE extracts.

SFC with capillary column accomplished to mass spectrometry (SFC-MS) was applied by Blum et al. (1997) to the analysis of thyme extracts. To our knowledge, this is the only work reported in the literature related to SFC of thyme extracts.

In this work, the fractionation of supercritical thyme extracts using semi-preparative SFC is described for the first time. First, SFE extractions at different conditions were carried out using pure CO<sub>2</sub> and on-line fractionation of the extract. Then, the different fractions collected were further separated by semi-preparative SFC using a packed column coupled to UV/Vis detector. Different conditions were explored, including the use of ethanol as cosolvent, to produce a fraction enriched in terpenoid type compounds.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Chemicals

Ethanol was HPLC grade from Panreac. CO<sub>2</sub> (N48) was supplied from Air Liquid. Thymol, borneol, camphor, eucalyptol and linalool were purchased from Sigma-Aldrich.

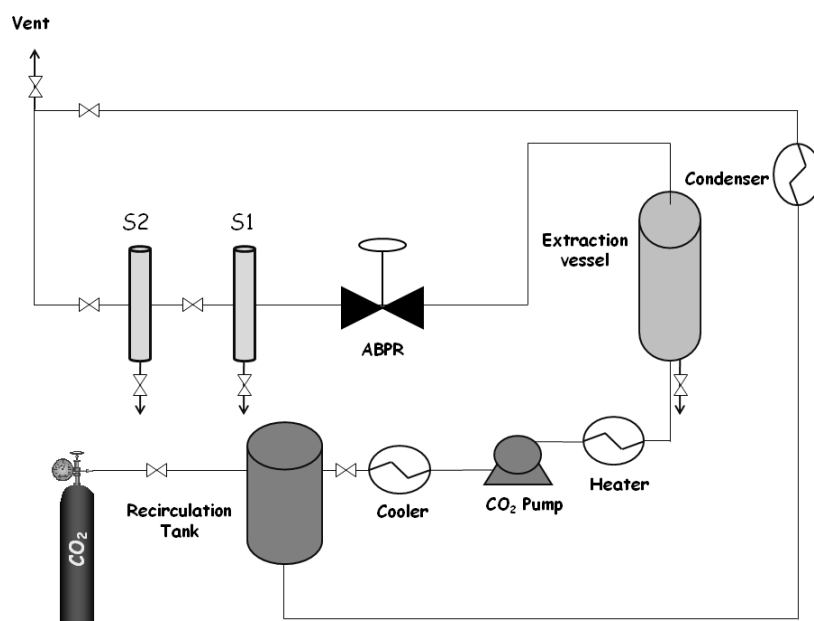
### 2.2. Thyme leaves preparation

The thyme sample (*thymus vulgaris*) consisted of dried leaves obtained from an herbalist's producer (Murcia, Spain). The sample was ground in a cooled mill and sample was sieving to size between 200 and 600 µm. The whole sample was stored at -20°C until use.

### 2.3. Supercritical Fluid Extraction (SFE)

Extractions were carried out in a pilot-plant scale supercritical fluid extractor (Thar Technology, Pittsburgh, PA, USA, model SF2000) comprising a 2 L cylinder extraction cell and two different separators (each of 0.5 L capacity) with independent control of temperature and pressure. The extraction device also includes a recirculation system, where CO<sub>2</sub> is condensed and pumped up to the desired extraction pressure. Figure 1 shows a scheme of the supercritical SFE device.

The extraction vessel has a height/diameter ratio of 5.5 (0.42 m height, 0.076 m internal diameter). For each experiment, the cell was filled with 0.55 kg of thyme (apparent density 275 kg/m<sup>3</sup>). For all experimental assays, temperature was set to 313 K in the extraction vessel and 308 K in both separators (S1 and S2). Extraction pressure was varied from 15 to 40 MPa (see Table 1). In the first separator (S1) the pressure was maintained at 10 MPa, while in the second separator (S2) decompression up to recirculation pressure ( $\approx$  5 MPa) was accomplished in all cases. The cascade decompression system produced two different extracts which were collected in S1 and S2. Extracts were kept at -20°C under N<sub>2</sub> and in the dark until analysis.



**Figure 1.** Schematic diagram of supercritical fluid extractor (SFE) employed in the present study to produce thyme extracts. ABPR: back pressure regulator; S1, separator 1 and S2 separator 2

**Table 1.** Extraction conditions and yield of thyme (*thymus vulgaris* L.) SFE assays.

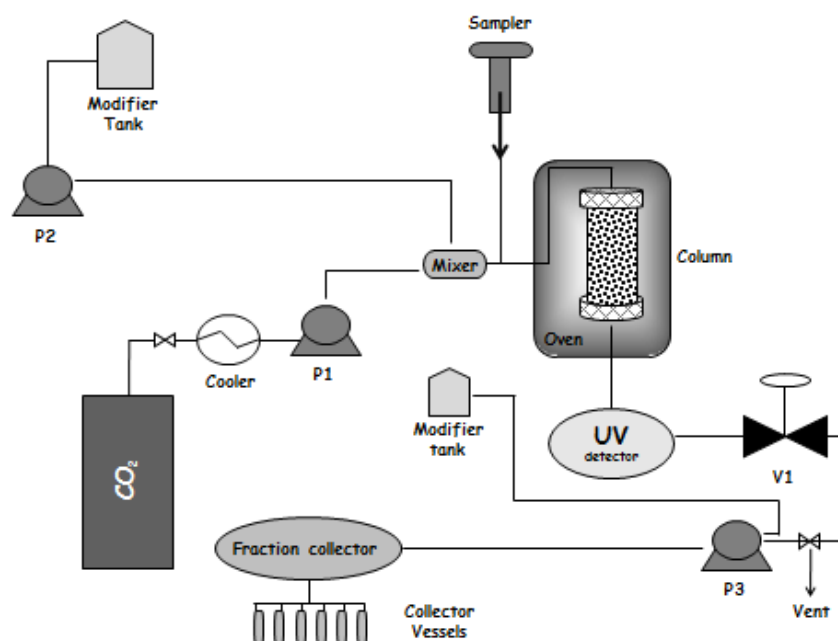
	Ext 1	Ext 2	Ext 3
extraction pressure (MPa)	15	30	40
CO <sub>2</sub> / thyme load (g/g)	34.9	26.2	26.2
S1 extract (g)	-	1.00	6.4
S2 extract (g)	18.2	21.8	19.3
total extract (g)	18.2	22.8	25.7
% yield (g extract / g thyme load)	3.31	4.14	4.67

## 2.4. Supercritical Fluid Chromatography (SFC)

The analytical and semi-preparative supercritical fluid chromatography device employed (Thar Investigator II, Thar Designs, USA) comprise a 25 cm × 4.6 mm i.d. Kromasil 60-5SIL packed column (5 µm particle diameter) which is placed inside an oven with temperature control. The CO<sub>2</sub> and modifier (ethanol) are pumped using high pressure pumps and column pressure is controlled by a back pressure regulator. The system is coupled to an UV/Vis detector Gilson (UV-151 model). The sample is injected through a Rheodyne 6 port valve (100 µL). The SFC system comprises six collector vessels in which the sample can be fractionated, with a controlled flow of solvent (also ethanol) to ensure completely recovery of injected material. Figure 2 shows a scheme of the supercritical SFC device employed.

The range of SFC conditions tested were pressures from 10 to 25 MPa, and temperatures from 313 to 333 K. The CO<sub>2</sub> flow rate was kept constant at 3 g/min. Ethanol was used as cosolvent at different percentages between 0 and 7%.

Partial loop (20 µL) of sample dissolved in chloroform (5 mg/ml) was injected to carry out the analytical study. In case of semi-preparative approach, full loop injection (100 µL) was employed with sample concentrate at 20 mg/ml. Successive injections were accomplished until a reasonably amount of sample (> 40 mg) was introduced in the SFC system. Fractions obtained in the collector vessels were evaporated under vacuum; the mass recovered was weighted (total mass recovered was greater than 80% of the mass injected) and analyzed by GC-MS. Semi-preparative SFC assays were carried out by duplicate.



**Figure 2.** Schematic diagram of the supercritical fluid chromatograph (SFC) used in the present study to fractionated thyme extract. ABPR: back pressure regulator.

## 2.5. GC-MS analysis

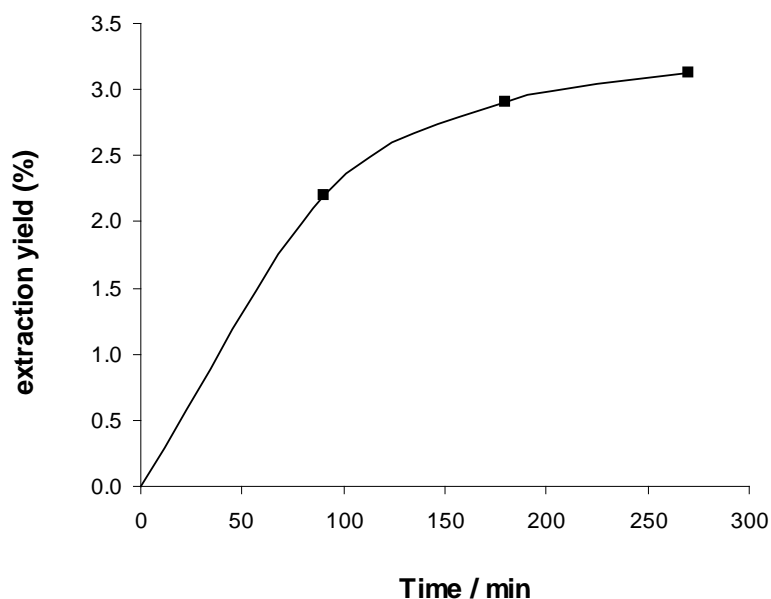
SFE thyme extracts and SFC fractions were analyzed using a GC-2010 (Shimadzu, Japan), equipped with a split/splitless injector, electronic pressure control, AOC-20i auto injector, GCMS-QP2010 Plus mass spectrometer detector, and a GCMS Solution software. The column used was a ZB-5 (Zebron) capillary column, 30 m x 0.25 mm I.D. and 0.25  $\mu\text{m}$  phase thickness. Helium, 99.996% was used as a carrier gas at a flow of 1 mL/min. Oven temperature programming was 60  $^{\circ}\text{C}$  isothermal for 4 min then increased to 106  $^{\circ}\text{C}$  at 2.5  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  and from 106 $^{\circ}\text{C}$  to 130 $^{\circ}\text{C}$  at 1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  and finally from 130 $^{\circ}\text{C}$  to 250  $^{\circ}\text{C}$  at 20  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , this temperature was kept constant for 10.2 min. Sample injections (1  $\mu\text{L}$ ) were performed in split mode (1:20). The inlet pressure of the carrier gas was 57.5 KPa. Injector temperature was of 250 $^{\circ}\text{C}$  and MS ion source and interface temperatures were 230 $^{\circ}\text{C}$  and 280 $^{\circ}\text{C}$ , respectively. The mass spectrometer was used in TIC mode, and samples were scanned from 40 to 500 amu. Thymol, borneol, camphor, eucalyptol and linalool were identified by comparison with standard mass spectra, obtained in the same conditions and compared with the mass spectra from library Wiley 229. Rests of the compounds were identified by

comparison with the mass spectra from Wiley 229 library. A calibration curve was employed for determination of thymol content.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. SFE of thyme leaves and GC analysis of the extracts

The kinetic behavior of thyme SFE was preliminary studied at 15 MPa and 313 K in order to set an adequate extraction time. Figure 3 shows the extraction yield obtained as a function of extraction time, when a CO<sub>2</sub> flow rate of 40 g/min was employed. As can be observed in the figure almost complete extraction of the plant material was attained after around 240 min of extraction. Then, the overall extraction yield obtained after 240 min using different extraction pressure and temperature were investigated.



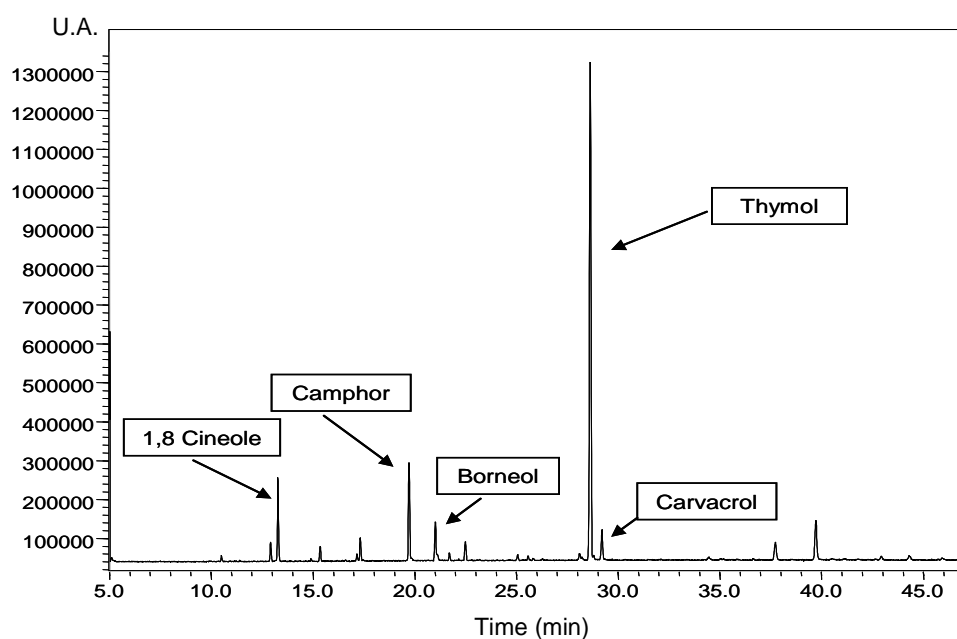
**Figure 3.** SFE extraction yield of thyme leaves at 15 MPa, 313 K and 40 g/min CO<sub>2</sub> flow rate.

The mass of extract collected in S1 and S2 separators for each SFE assay is given in Table 1. As expected, total extraction yield increases with pressure. At 15 MPa (Ext 1 in Table 1) no extract was recovered from S1 separator. Moreover, the material collected in S1 significantly increases with increasing extraction pressure



(Ext 2 and 3). The higher extraction pressures, the higher CO<sub>2</sub> density, and thus, the solubility of the solutes increase and larger amounts of material are extracted.

The composition of the material recovered in both separator 1 and 2 were analyzed by GC-MS using the method described previously. Table 2 gives the composition of the extracts, in terms of the percentage of peak area of the compounds identified. A typical chromatogram of thyme extract is shown in Figure 4. Several terpenoid type compounds, i.e. monocyclic terpenoids such as thymol, carvacrol and  $\alpha$ -terpineol, and bicyclic terpenoids such as camphor, eucalyptol and borneol, were identified in the extracts. In view of Table 2 and Figure 4, thymol is the major terpenoid present in all fractions collected. Quantification of thymol content, based on



**Figure 4.** GC-MS Chromatogram of supercritical thyme extract.

**Table 2.** Composition of thyme SFE extracts in terms of % peak area of compounds identified by GC-MS.

Retention time (min)	Identification	Ext 1 S2	Ext 2 S1	Ext 2 S2	Ext 3 S1	Ext 3 S2
10.48	1-octen-3-ol	0.48	0.36	0.57	0.00	0.67
12.90	<i>p</i> -cymene	1.77	0.67	1.84	2.23	2.37
13.26	1,8 cineole	7.23	0.53	0.54	0.87	1.07
15.34	sabinene	1.39	0.89	0.69	1.01	0.70
17.15	trans-sabinene hydrate	0.64	0.46	0.00	0.00	0.00
17.31	linalool	2.05	4.03	2.41	3.55	2.27
19.71	camphor	9.55	0.93	0.48	0.00	1.00
21.00	borneol	3.42	2.59	1.95	2.23	1.86
21.69	4-terpineol	0.73	0.64	0.00	0.00	0.53
22.48	$\alpha$ -terpineol	1.89	0.53	0.42	0.00	0.58
25.05	thymyl methyl ether	0.51	0.51	0.40	0.00	0.45
25.56	carvacrol methyl ether	0.43	0.47	0.00	0.00	0.00
28.63	thymol	57.4	76.84	77.0	82.04	74.08
29.19	carvacrol	3.44	4.85	4.80	4.62	4.42
37.72	$\beta$ -caryophyllene	2.53	2.60	1.60	0.00	1.59
39.71	N-I*	5.62	1.65	6.57	2.49	7.74
50.33	caryophyllene oxide	0.85	1.46	0.66	0.97	0.65

\* peak not identified in the GC-MS analysis

calibration curve, is given in Table 3. As can be concluded from the table, the concentration of thymol in the total extracts (S1 + S2 fractions) decreases with increasing pressure (29.6 %wt in Ext 1, 27.3 %wt in Ext 2 and 22.3 %wt in Ext 3). That is, although more material is extracted at higher pressures, thymol concentration in the total extract decreases due to an increasing co-extraction of compounds that are not determined in the GC-MS analysis (mainly hydrocarbons, waxes, pigments, etc). This decrease of thymol concentration in the extract at higher extraction pressures was also reported by Zekovic et al. (2000). Additionally, a selective concentration of thymol in S1 separator of Ext 2 was achieved (42.6 % wt) by on-line fractionation of the extract, although very low yield was obtained in this fraction (see Table 1).

**Table 3.** Thymol content (% wt) in the SFE fractions collected.

	S1	S2	total extract
Ext 1	-	29.6	29.6
Ext 2	42.6	26.6	27.3
Ext 3	8.5	26.9	22.3

### 3.2. SFC concentration of terpenoids from thyme SFE extracts

The sample collected in S2 separator of Ext 1 (29.6 % wt thymol) was utilized to study the isolation of thymol and other terpenoids by semi-preparative SFC. The fraction collected in S1 separator of Ext 2 (42.6 % wt thymol) was not considered for the SFC fractionation study due to its very low yield (0.2 %).

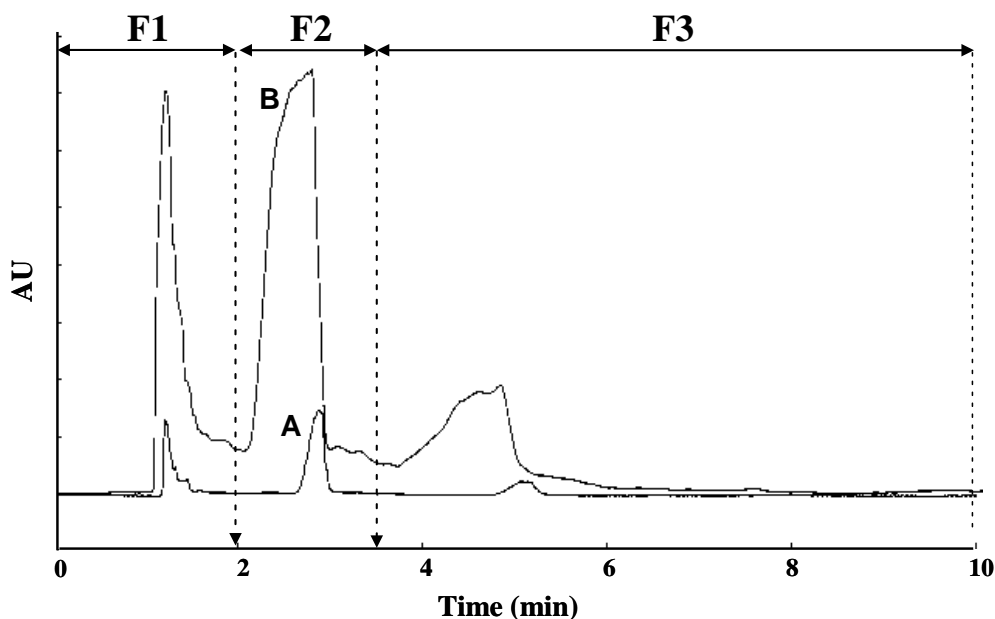
The elution of standard thymol in the SFC system was firstly studied. The variation of thymol retention time is given in Table 4 as a function of pressure, temperature and amount of cosolvent (ethanol) employed, when SCCO<sub>2</sub> is employed as mobile phase. As expected, retention time decreases with increasing pressure and temperature. When no cosolvent is employed, a considerable decrease of elution time is observed when temperature is increased from 313 to 323 K, but similar values were obtained at 323 and 333 K. Additionally, by adding ethanol cosolvent in the supercritical CO<sub>2</sub> mobile phase, thymol retention time is also reduced. For example, at 15 MPa and 323 K thymol elutes at 2.8 min when 3% ethanol is added. These elution times are significantly lower than the values obtained with 0% ethanol cosolvent (8.9 min).

Bearing in mind the elution times of thymol at different temperature, pressure and % wt cosolvent, the supercritical thyme extract was injected at 323 K in analytical mode. Different pressures (10 to 25 MPa) and ethanol co-solvent concentration (3 to 7 % wt) were explored. The chromatographic profiles in all conditions were similar although better resolution was obtained at 15 MPa and using 3 % wt ethanol cosolvent. Then, the SFC assays were carried out at these conditions in semi-preparative mode by collecting different fractions at controlled intervals of time.

**Table 4.** Variation of thymol retention time (min) with pressure, temperature and ethanol content when SCCO<sub>2</sub> is employed as mobile phase.

	ethanol content in SCCO <sub>2</sub>				
		0 % wt		3 % wt	7 % wt
P (MPa)	313 K	323 K	333 K	323 K	323 K
10	19.1	15.7	--	4.1	2.4
15	13.3	8.9	--	2.8	2.1
20	11.3	7.4	6.9	2.3	2.0
25	9.9	6.6	5.9	--	--

Figure 5 shows the SFC chromatogram of thyme SFE extract (Ext 1) at 323 K, 15 MPa and with 3 % ethanol cosolvent. Chromatogram A on Figure 5 corresponds to the injection of 5 mg/ml concentrate of supercritical thyme extract and chromatogram B corresponds to injections carried out at 20 mg/ml. In both cases, a distinct peak at similar elution time of thymol (2.8 min) can be observed in the figure. Figure 5 shows the intervals of time selected to fractionate the thyme extract sample. The fractionation was as follows: fraction 1(F1), from 0 to 1.9 min; fraction 2 (F2), from 1.9 to 3.4 min and fraction 3 (F3), from 3.4 min to 10 min. At these conditions, a good



**Figure 5.** SFC chromatogram of thyme SFE extract (Ext 1) at 15 MPa, 323 K and 3% ethanol co-solvent. (A) Injections carried out at 5 mg/ml; (B) Injections carried out at 20 mg/ml. F1, F2 and F3 indicate the intervals of time employed to collect the different fractions in the SFC semi-preparative system.

separation was obtained in a reasonable time. The isolation and enrichment of thymol in fraction 2 was carried out following a protocol consisting in the injection of the sample 20-30 times and collection in the collector vessels at the selected times, as mentioned above.

Table 5 gives the concentration of thymol obtained together with the amount of thymol recovered in each fraction. As expected, the concentration of thymol was considerably increased in F2 with respect to the original supercritical thyme extract (Ext 1). As can be deduced from the table a 1.8 fold increase of thymol was obtained in F2 fraction.

Other minor terpenoids present in thyme extract were not quantified. Nevertheless, considering that all samples were injected at the same concentration, the ratio of the peak areas obtained in the GC-MS analysis (see Table 6) are representative of the corresponding concentration factor ( $r_i = \text{peak area in F2} / \text{peak area in extract}$ ) achieved. Thus, it can be also concluded that around a 2 fold increase of carvacrol, borneol and  $\alpha$ -terpineol was obtained in F2, while camphor and eucalyptol were not present in this fraction.

With respect to thymol recovery, the material collected in F2 fraction contained 97.2 % of the total thymol recovered.

**Table 5.** Thymol concentration and recovery obtained in the semi-preparative SFC fractionation of supercritical thyme extract (Ext 1) at 15 MPa, 50°C and 3% ethanol.

fraction	% wt thymol	% thymol recovery
		(mass in fraction / total recovered)
F1	< 1.0	0.8
F2	51.4	97.2
F3	≈ 1.0	1.9

**Table 6.** Concentration factor ( $r_i$  = peak area in F2 / peak area in extract) of the main terpenoids detected by GC-MS.

Compound	peak area in extract	peak area in fraction F2	$r_i$
Thymol	6556653	11692817	1.78
Carvacrol	391211	1024241	2.62
Borneol	388928	609629	1.57
$\alpha$ -Terpineol	215515	447023	2.07
Eucalyptol	825521	n. d.	0.00
Camphor	1090214	83315	0.08

\* Non detected

## Conclusions

SFE of *thymus vulgaris* was carried out at pilot-plant scale at 40°C and different extraction pressures (15, 30 and 40 MPa). The concentration of terpenoid-type compounds (thymol, carvacrol, borneol, etc.) in the extract was higher at the lower extraction pressure employed. The supercritical extract was fractionated in a SFC system, obtaining three different fractions from the original supercritical extract. The preliminary screening produced an extract fraction in which a 1.8 fold increase of thymol was achieved at 15 MPa, 50°C and 3% ethanol cosolvent. Further experiments are being developed in order to improve purification of terpenoids in SFC preparative scale.

## Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the financial support from the Ministerio de Ciencia e Innovación (project 25506 FUN-C-FOOD) and Comunidad Autónoma de Madrid (ALIBIRD, project S-505/AGR-0153).

### 5.3.3 Isolation of carnosic acid by supercritical CO<sub>2</sub> chromatography from rosemary extracts

**Gonzalo Vicente**, Mónica R. García-Risco\*, Tiziana Fornari, Guillermo Reglero

*(Enviada al Journal of Chromatography A)*

#### **Abstract**

Supercritical fluid chromatography (SFC) in analytical and semi-preparative scale was studied to separate rosemary (*Rosmarinus officinalis*) supercritical extracts to produce fractions with high antioxidant activity. Carnosic acid, the major antioxidant present in rosemary supercritical extracts, was the target compound to be isolated in the fractions produced. First, rosemary extracts were produced in a supercritical CO<sub>2</sub> pilot-plant employing different extraction conditions, in order to obtain samples with diverse composition. The content of carnosic acid was determined and the DPPH test was accomplished in order to assess the antioxidant activity of the different samples produced. Then, using some of these samples, experiments were carried out in the SFC system testing the performance of four different chromatographic columns to isolate and recover a fraction with high concentration of carnosic acid. The four chromatographic columns employed were silica and 2-ethylpyridine especially packed for SFC, and silica and diol especially packed for HPLC. The SFC fractionation conditions explored were 10-20 MPa, 313-333 K and 5-20% of cosolvent (ethanol). Using the first three columns, it was possible to isolate fractions with concentrations of carnosic acid greater than 80 mass %.



## 1. Introduction

Natural sources of bioactive substances and new industrial approaches to extract and isolate the target ingredients are gaining much attention in the food, cosmetic, nutraceuticals and pharmacy field. One important and valuable property of many spices and herbs which are matter of intensive studies is that they contain natural antioxidants. Antioxidants, besides their role as food stabilizers, can protect cells against the effects of free radicals and thus, play an important role in heart disease, cancer and other diseases (Suhaj. 2006; Bubonja-Sonje y col., 2011; Zegura y col., 2011; Visentin y col., 2012; Yesil-Celiktas y col., 2010).

Indeed, among innovative process technologies, supercritical fluid technology is the most widely studied application. Carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) is the most popular supercritical solvent utilized, and is safe, readily available, has a low cost and allows operations at relatively low pressures and at near-room temperatures. Further, CO<sub>2</sub> is particularly advantageous for processing food materials; it leaves no residue in the extracts, avoiding the expensive post-processing for solvent elimination. Thus, supercritical CO<sub>2</sub> technology can be applied with confidence to extract bioactive compounds, particularly for use in the food and nutraceutical industries. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of plant material has been the subject of several publications; the reader is referred to the recent reviews presented in references (Reverchon y De Marco. 2006; Fornari y col., 2012a; Fornari y col., 2012b; Herrero y col., 2010; Pourmortazavi y Hajimirsadeghi. 2007; Herrero y col., 2006).

Supercritical fluid chromatography (SFC) is also a novel procedure employed to separate bioactive substances. SFC embraces many of the features of liquid and gas chromatography, and occupies an intermediate position between the two techniques. Because solubility and diffusion can be optimized by controlling both pressure and temperature, chromatography using a supercritical fluid as the mobile phase can achieve better and more rapid separations than liquid chromatography. Several examples can be found in the literature of preparative SFC applications to separate high-value materials, such as lipids (Sesti-Oseo y col., 2003; Taylor y col., 2002; Johannsen y Brunner. 2003; Alkio y col., 2000; Pettinello y col., 2000), vitamins (Pyo y col., 2000; Ibañez y col., 1999; Turner y col., 2001) and other bioactive compounds

from vegetal extracts Sugiyama y col., 1985; Buskov y col., 2000; Desmortreux y col., 2009; Abrahamsson y col., 2012].

Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) has been recognized as one of the plants with large antioxidant activity. The substances linked with its antioxidant activity are mainly phenolic diterpenes (carnosol, rosmanol, carnosic acid, methyl carnosate) and phenolic acids (rosmarinic and caffeic acids) (Ibañez y col., 2003; Terpin y col., 2009; Szumny y col., 2010; Napoli y col., 2010; Zaouali y col., 2010). Different authors (Carvalho y col., 2005; Reverchon y Sanantore. 1992) compared supercritical rosemary extracts with those obtained using liquid solvents (ethanol and hexane) or hydrodistillation, and confirmed superior antioxidant activity of the supercritical extracts.

The supercritical CO<sub>2</sub> extraction of rosemary leaves has been widely studied and reported in the literature, (Carvalho y col., 2005; Reverchon y Sanantore. 1992; Ibañez y col., 1999; Cavero y col., 2005; Yesil-Celiktas y col., 2007; Huang y col., 2008; Bensebia y col., 2009; Herrero y col., 2010; García-Risco y col., 2011; Vicent y col., 2012; Ahmed y col., 2012; Visentin y col., 2011). Nevertheless, regarding supercritical chromatography of rosemary only the works of Ramirez et al. (Ramirez y col., 2004, 2006 y 2007) were reported. In the first of these works (Ramírez y col., 2004), the authors evaluated the separation of carnosic acid from rosemary by SFC employing specially designed capillary chromatographic columns, that is commercial octadecylsilica and silica particles coated with a stationary phase commonly used in gas chromatography, such as Carbowax 20M (polyethyleneglycol) of high polarity. Using high pressures (pressure gradient from 15 to 37 MPa) and temperatures (column temperature of 100°C) the elution of carnosic acid was achieved with high selectivity and using pure CO<sub>2</sub> (no cosolvent). Later, a preparative-SFC system was employed by the same authors (Ramírez y col., 2006) to fractionate a supercritical rosemary extract, using a LC-Diol packed column at 13 MPa, 80°C and using 10 % of ethanol as CO<sub>2</sub> cosolvent. The extract was separated in three different fractions and in the second fraction a 1.2 fold increase of carnosic acid was obtained. Consequently, an increase of the antioxidant capacity ( $\approx 20\%$ ) was attained with respect to the original extract. At the same conditions of pressure and temperature, rosemary supercritical extracts were also fractionated using a home-made column (Ramírez y col., 2007)

which was prepared using a new method for packing commercial silica particles coated with a stationary phase (5% phenyl-, 95% methylsilicone). Also in this case, the carnosic acid concentration factors obtained were around 1.2.

In this work, SFC was applied to fractionate rosemary supercritical extracts in order to produce fractions with high concentration of carnosic acid and thus, with high antioxidant activity. For this purpose, different commercial columns and different process condition were explored, including pressure, temperature and amount of cosolvent (ethanol) added to the supercritical CO<sub>2</sub> mobile phase.

## 2. Materials and methods

### 2.1 Chemicals

Carnosic acid ( $\geq 91\%$ ), carnosol ( $>95\%$ ), camphor ( $>97\%$ ),  $\alpha$ -terpineol ( $>97\%$ ) and linalool ( $>97\%$ ) were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). 1,8-cineole (98%) and borneol ( $>99\%$ ) was from Fluka. Ethanol and phosphoric acid (85%) were HPLC grade from Panreac. Acetonitrile was HPLC grade from Lab Scan (Dublin, Ireland). 2, 2'-Diphenyl-1-picrylhydrazyl hydrate (DPPH, 95% purity) were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). CO<sub>2</sub> (N38) was supplied from Carburos Metálicos (Madrid, Spain).

### 2.2 Rosemary supercritical extracts preparation

Dried and grounded rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) leaves obtained from an herbalist's producer (Murcia, Spain) were employed in the supercritical CO<sub>2</sub> pilot-plant (Thar Technology, Pittsburgh, PA, USA, model SF2000) to produce different rosemary supercritical extracts. A scheme of the supercritical extraction device can be found elsewhere (Vicente y col., 2012).

Four extractions were accomplished at 313 K (temperature of extraction cell and separators), extracting 0.55 kg of rosemary leaves with 60 g/min of CO<sub>2</sub>. In selected assays, fractionation of the extracted material was accomplished by setting the pressure of the first separator (S1) to 10 MPa, while the second separator (S2) was maintained at the recirculation system pressure (5 MPa). In this case, two different samples were collected: one sample from S1 cell and the other from S2 cell.

Extractions 1 to 3 were carried out at 30 MPa. No fractionation of the extracted material was accomplished in extraction 1 while fractionation during 60 min was carried out in extractions 2 and 3 and then, extraction continued for 240 min and 300 min, respectively, without fractionation. Then, two samples were collected (from S1 and S2 separators) in the case of extraction 2 and 3. In extraction 4, the residual plant matrix from extraction 1 was utilized as raw material, and the assay was accomplished without fractionation at 15 MPa, with 10 % mass of ethanol as cosolvent and during 180 min. The extracts produced (Table 1) were kept at -20°C under N<sub>2</sub> and in the dark until analysis.

**Table 1.** Extraction yield, carnosic acid content, key volatiles content and EC<sub>50</sub> value of the different rosemary supercritical extracts (SRE) produced in the pilot-plant supercritical extractor.

Extraction	Supercritical rosemary extract (SRE)	yield (%)	carnosic acid (mass %)	key volatiles (mass %)	EC <sub>50</sub> (µg/mL)
1	SRE1	4.52 ± 0.17	14.44	12.79	18.10
2	SRE2-1	2.43 ± 0.17	20.12	13.59	15.76
	SRE2-2	1.49 ± 0.21	3.08	21.70	40.15
3	SRE3-1	2,83 ± 0.18	22.83	14.42	14.90
	SRE3-2	1,53 ± 0,22	3.12	20.90	40.04
4	SRE4	4.93 ± 0.25	32.60	2.04	10.00

### 2.3GC-MS analysis

The essential oil compounds of samples were determined by GC-MS-FID using 7890A System (Agilent Technologies, U.S.A.) comprising a split/splitless injector, electronic pressure control, G4513A auto injector, a 5975C triple-Axis mass spectrometer detector, and GC-MS Solution software. The column used was an Agilent 19091S-433 capillary column, 30 m x 0.25 mm I.D. and 0.25 µm phase thickness. Helium, 99.996% was used as a carrier gas at a flow of 29.4 ml/min and inlet pressure of 28.823 Psi. Oven temperature programming was 60°C isothermal for 4 min then increased to 106 °C at 2.5 °C/min and from 106°C to 130°C at 1°C/min and finally from 130°C to 250 °C at 20°C/min, this temperature was kept constant for 10

min. Sample injections (1  $\mu$ l) were performed in split mode (1:10). Injector temperature was of 250°C and MS ion source and interface temperatures were 230 and 280°C, respectively. The mass spectrometer was used in TIC mode, and samples were scanned from 40 to 500 amu. Key volatile oil compounds (1,8 cineole, camphor, borneol, linalool and  $\alpha$ -terpineol) were identified by comparison with standard mass spectra, obtained in the same conditions and compared with the mass spectra from library Wiley 229. The rest of compounds were identified by comparison with mass spectra from Wiley 229 library. A calibration curve was employed to quantify each of the key volatiles. GC-MS analyses were carried out by duplicate and the average standard deviation obtained was  $\pm 0.08\%$ .

## 2.4 HPLC analysis

Carnosic acid was identified and quantified in the samples using an HPLC (Varian Pro-star) equipped with a Microsorb-100 C<sub>18</sub> column (Varian) of 25 cm  $\times$  4.6 mm and 5  $\mu$ m particle size. The mobile phase consisted of acetonitrile (solvent A) and 0.1% of phosphoric acid in water (solvent B) applying the following gradient: 0–8 min, 23% A, 8–25 min, 75% A, 25–40 min 75% A and the 40–45 min 23% A. Initial conditions were gained in 5 min. The flow rate was constant at 0.7 ml/min. Injection volume was 20  $\mu$ l and the detection was accomplished by using a diode array detection system (Varian) storing the signal at a wavelength of 230, 280 and 350 nm.

## 2.5 Antioxidant activity by the DPPH test

The effect of each extract on DPPH radical was estimated according to the procedure described by Brand-Williams et al. (1995). An aliquot (50  $\mu$ l) of ethanol solution prepared from the extract concentrations (from 30 to 5  $\mu$ g/ml) was added to 1.950  $\mu$ l of DPPH in ethanol (23.5  $\mu$ g/ml) prepared daily. Reaction was completed after 3 h at room temperature and absorbance was measured at 517 nm in a Nanovette Du 730 UV spectrophotometer (Beckman Coulter, USA). The DPPH concentration in the reaction medium was calculated from a calibration curve determined by linear regression. Ethanol was used to adjust zero and DPPH-ethanol solution as a reference sample.

The method entails the neutralization of free radicals of DPPH by the antioxidant extracts. The percentage of remaining DPPH against the extract concentration was then plotted to obtain the amount of antioxidant necessary to decrease the initial DPPH concentration by 50% or EC<sub>50</sub> (µg/ml). The lower the EC<sub>50</sub>, the higher the antioxidant power.

## 2.6 SFC fractionation

The analytical and semi-preparative supercritical fluid chromatography device employed was from Thar Process Inc. (Thar Investigator II, Thar Designs, USA).

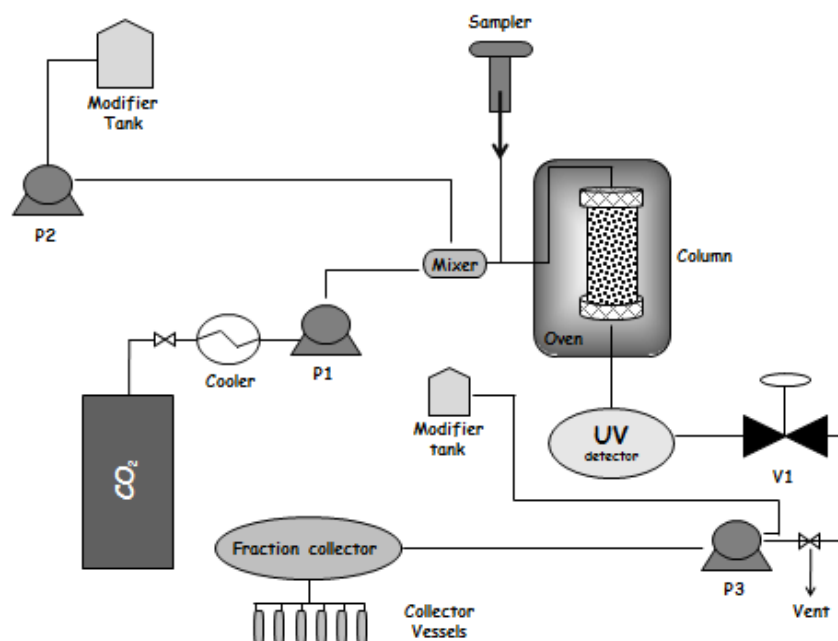
The CO<sub>2</sub> and cosolvent (ethanol) are pumped using high pressure pumps and column pressure is controlled by a back pressure regulator. The system is coupled to an UV/Vis detector Gilson (UV-151 model). The sample is injected through a Rheodyne 6 port valve (20 to 100 µl). The SFC system comprises six collector vessels in which the sample can be fractionated, with a controlled flow of solvent (also ethanol) to wash tubing and ensure completely recovery of injected material. Figure 1 shows a scheme of the SFC system.

Four different packed columns (PC) were tested, all of them with the same dimension: length (25cm), particle size (5 µm) and i.d. 4.6 mm. (PC1) Kromasil 60-DIOL, (PC2) ACE 5 silica, (PC3) Viridis SFC silica and (PC4) Viridis SFC 2-Ethylpyridine (Waters). All of them were placed inside an oven with temperature control.

According to the characteristics of the SFC system, the range of operating temperatures was 313-333 K, pressures up to 27 MPa and CO<sub>2</sub> flow up to 10 g/min. In this work, the range of conditions tested were pressures from 10 to 20 MPa, and temperatures of 313 and 333 K. The CO<sub>2</sub> flow rate was kept constant at 3 g/min and ethanol was used as cosolvent at different percentages between 5 - 20 mass %.

The samples (supercritical rosemary extracts) were injected at 1 mg/ml in analytical mode and at 5 mg/ml in semi-preparative mode. Full loop injection was employed in semi-preparative mode (100 µl) and successive injections were accomplished until a reasonably amount of sample was recovered (> 20 mg).

Fractions obtained in the collector vessels were evaporated under vacuum; the mass recovered was weighted and analyzed by GC-MS and HPLC.



**Figure 1.** Scheme of the SFC experimental device.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Production of supercritical rosemary extracts (SRE)

Table 1 shows the extraction yield, the carnosic acid content, the total content of key volatile compounds (1,8 cineole, camphor, borneol, linalool and  $\alpha$ -terpineol) and the EC<sub>50</sub> value of the supercritical rosemary extracts produced in the assays 1 to 4 described in the experimental section. The different conditions applied in the extractions were target to produce samples with diverse content of carnosic acid, and the concentrations of carnosic acid obtained were in the range 3.1 to 32.6 % mass.

Table 2 shows all essential oil compounds identified in these samples, in terms of the percentage area of the GC chromatogram obtained. As can be observed in the table, 1,8 cineole, camphor, borneol, linalool and  $\alpha$ -terpineol are the main compounds present, representing more than 80 % of rosemary essential oil. Further, it can be observed that the essential oil profile is rather similar despite the extraction procedure applied.

As can be observed from Table 1, higher carnosic acid content was obtained when ethanol was employed as CO<sub>2</sub> cosolvent (SRE4 sample, which contains 32.60 % mass of carnosic acid). Extraction 1, 2 and 3 were carried out without cosolvent and thus, the content of carnosic acid was lower. As expected, due to the fractionation procedure accomplished in extractions 2 and 3, the samples collected in S1 (SRE2-1 and SRE3-1) contain higher concentrations of carnosic acid and lower amounts of volatile oil compounds than the samples collected in S2 (SRE2-2 and SRE3-2). The minor differences between extractions 2 and 3 are due to the different extraction time applied after an hour of fractionation: larger extraction time (extraction 3) gives higher content of carnosic acid (see Table 1).



**Table 2.** Main essential oil constituents of rosemary supercritical extracts detected by GC-MS.

		% Area					
		Ext1		Ext 2		Ext 3	
Retention Time							
(min)	Component	SRE1	SRE2-1	SRE2-2	SRE3-1	SRE3-2	SRE4
6.26	$\alpha$ -Pinene	1.06	1.80	0.49	1.82	0.50	0.00
6.83	Camphene	0.54	0.88	0.34	0.90	0.38	0.00
8.06	$\beta$ -Pinene	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
8.27	1-Octen-3-ol	0.00	0.00	0.35	0.00	0.40	0.00
8.64	3 Octanone	0.00	0.65	0.38	0.70	0.28	0.00
8.84	$\beta$ - Myrcene	0.45	1.11	0.58	1.15	0.68	0.00
10.53	r-Cimene	1.07	2.10	1.34	2.05	1.64	0.00
10.74	Limonene	0.98	1.80	1.25	1.78	1.35	0.00
10.89	1.8 Cineole	52.91	54.36	38.89	54.00	39.19	55.60
14.89	Linalool	1.51	1.14	1.94	1.19	1.74	0.00
17.28	Camphor	17.44	19.53	25.33	20.20	25.93	19.65
18.55	Borneol	6.06	4.11	8.31	4.14	8.11	6.88
18.70	$\beta$ - Terpineol	1.43	0.83	1.67	0.90	1.27	0.00
19.28	1-Terpinen-4-ol	1.43	1.14	1.96	1.12	1.46	1.11
19.83	r-Cimene-8-ol	0.00	0.00	0.48	0.00	0.45	0.00
20.12	$\alpha$ -Terpineol	7.20	4.10	8.48	4.00	8.22	7.79
21.12	Verbenone	0.00	3.29	6.00	3.35	6.40	0.00
25.65	Bornyl Acetate	0.57	0.42	0.80	0.50	0.50	0.00
34.54	Caryophyllene	7.35	2.74	1.40	2.20	1.49	8.96
37.21	Caryophyllene Oxide	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

In the case of sample SRE4, the very low content of essential oil compounds could be attributed to the fact that the plant matrix was previously extracted with pure CO<sub>2</sub> and thus, essential oil substances were almost exhausted.

Table 1 also shows the EC<sub>50</sub> value of the DPPH test determined for all samples produced. As expected, the EC<sub>50</sub> values decreased as carnosic acid content increased. That is, higher antioxidant power was determined with the increasing content of the main antioxidant substance (carnosic acid) present in the extracts.

### **3.2 Supercritical fluid chromatography isolation of carnosic acid**

*Analysis of the resolution of the different packed columns:* Different chromatographic packed columns (PC1 to PC4) and process conditions were studied in order to attain a suitable resolution of the chromatographic system. The SFC conditions tested were pressures in the range of 10-20 MPa, temperatures of 313-333 K and 5-20 % mass of ethanol cosolvent. The CO<sub>2</sub> flow rate was kept constant at 3 g/min in all experiments.

First, the elution of standard carnosic acid in the SFC system was studied using the PC3 (Viridis SFC silica) packed columns. Table 3 shows the retention times attained as a function of pressure, temperature and amount of cosolvent (ethanol). As described in the literature (Ramírez y col., 2004), no elution of carnosic acid was attained at the working pressures when no cosolvent was employed, due to the low solubility of carnosic acid in pure CO<sub>2</sub> (Chafer y col., 2005). Furthermore, as can be deduced from Table 3, the effect of temperature becomes less significant as increasing the amount of cosolvent. On the other hand, as expected, for increasing pressure decreasing retention time was observed. These tendencies were the same for all packed columns studied.

The resolution of the different columns was tested by observing the separation of a carnosol + carnosic acid mixture ( $\approx$  70 % mass carnosic acid). These two compounds were selected as model mixture to separate in the chromatographic system, because they are the most abundant phenolic antioxidants of rosemary and have very similar chemical structure. In the case of silica columns, namely the PC2 (ACE 5 silica) and PC3 (Viridis SFC silica) columns, 5-10 % mass of ethanol was

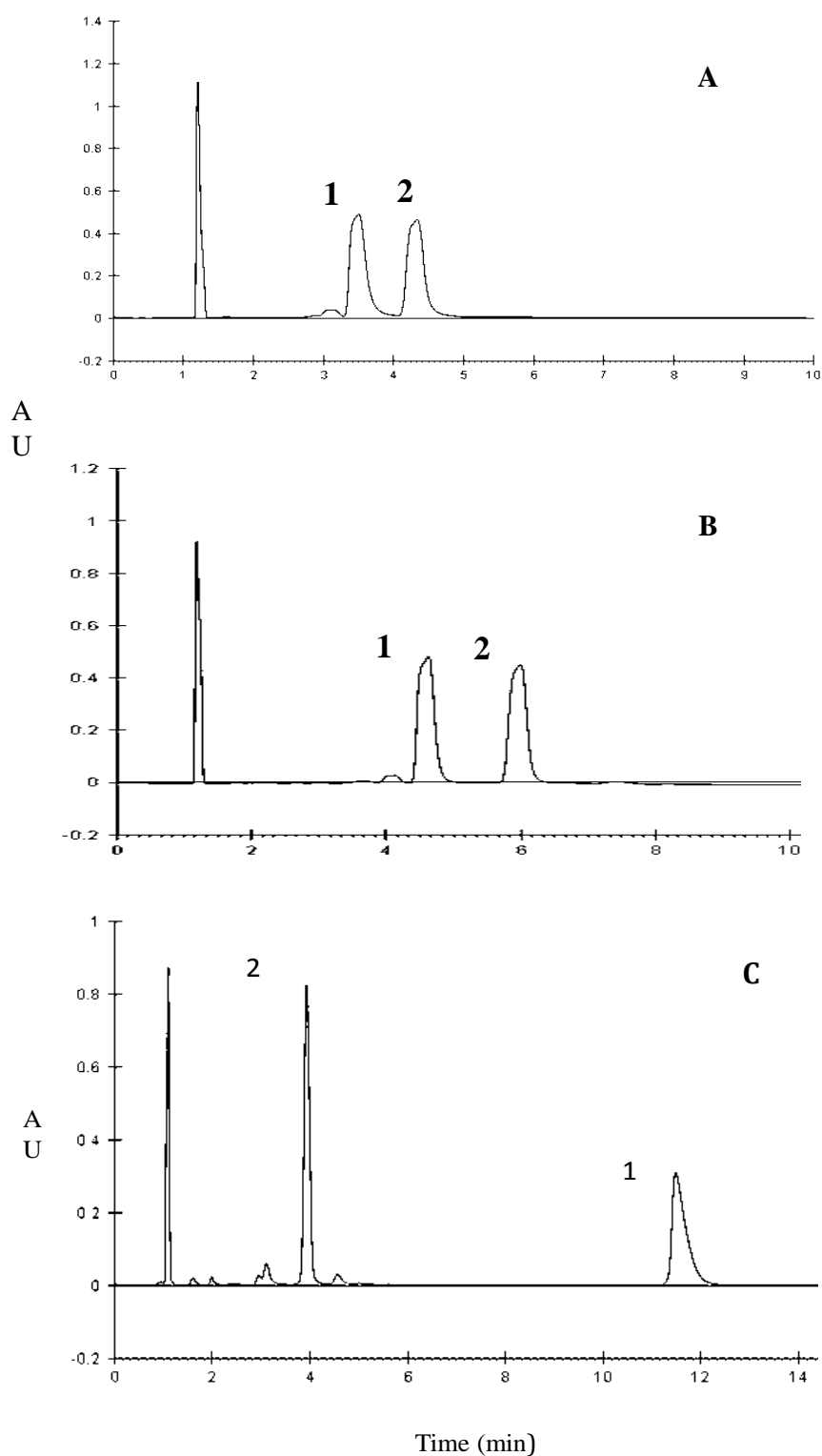
employed as cosolvent, but in the case of PC1 (Kromasil 60-DIOL) and PC4 (Viridis SFC 2-Ethylpyridine) columns, higher amounts of cosolvent were necessary ( $\approx 20$  % mass ethanol) since these columns have different polarity than silica columns and thus because the compounds were stronger retained.

**Table 3.** Variation of carnosic acid retention time with temperature, pressure and amount of cosolvent (ethanol). CO<sub>2</sub> flow = 3 g/min. Carnosic acid concentration = 1 g/ml. Volume injected = 20  $\mu$ l. Column: Viridis SFC silica (PC3).

Pressure MPa	10 % ethanol			5 % ethanol		
	313 K	323 K	333 K	313 K	323 K	333 K
10	2,64 $\pm$ 0,08	3,67 $\pm$ 0,02	7,82 $\pm$ 0,05	4,94 $\pm$ 0,02	9,44 $\pm$ 0,09	*
15	2,07 $\pm$ 0,07	2,12 $\pm$ 0,02	2,47 $\pm$ 0,05	3,71 $\pm$ 0,02	4,40 $\pm$ 0,05	5,64 $\pm$ 0,01
20	1,96 $\pm$ 0,01	1,95 $\pm$ 0,00	2,02 $\pm$ 0,03	2,99 $\pm$ 0,05	3,30 $\pm$ 0,01	3,82 $\pm$ 0,33

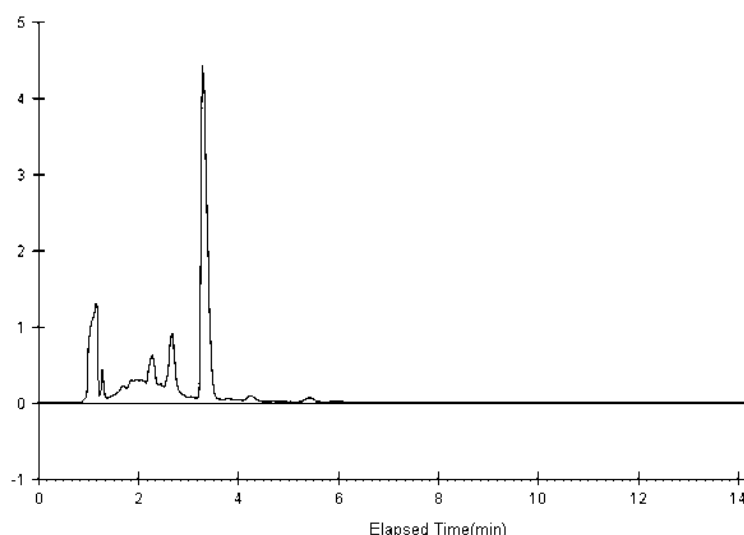
\*no elution was observed in 40 minutes

Figure 2 compares the attained with the PC2, PC3 and PC4 columns at 10 MPa and 313 K. Resolution was rather better in the case of columns specifically designed for SFC, namely PC3 and PC4 columns. Further, the separation of carnosol and carnosic acid attained with PC4 column is considerably enhanced in comparison to that obtained with the PC3 silica columns. The same results were obtained in the whole ranges of pressure and temperature explored.



**Figure 2.** Elution of a mixture of (1) carnosic acid and (2) carnosol at 10 MPa and 313 K: (A) ACE 5 silica (PC2) and (B) Viridis SFC silica (PC3) packed columns with 5 % mass ethanol, and (C) Viridis SFC 2-Ethylpyridine packed column (PC4) with 20 % mass ethanol.

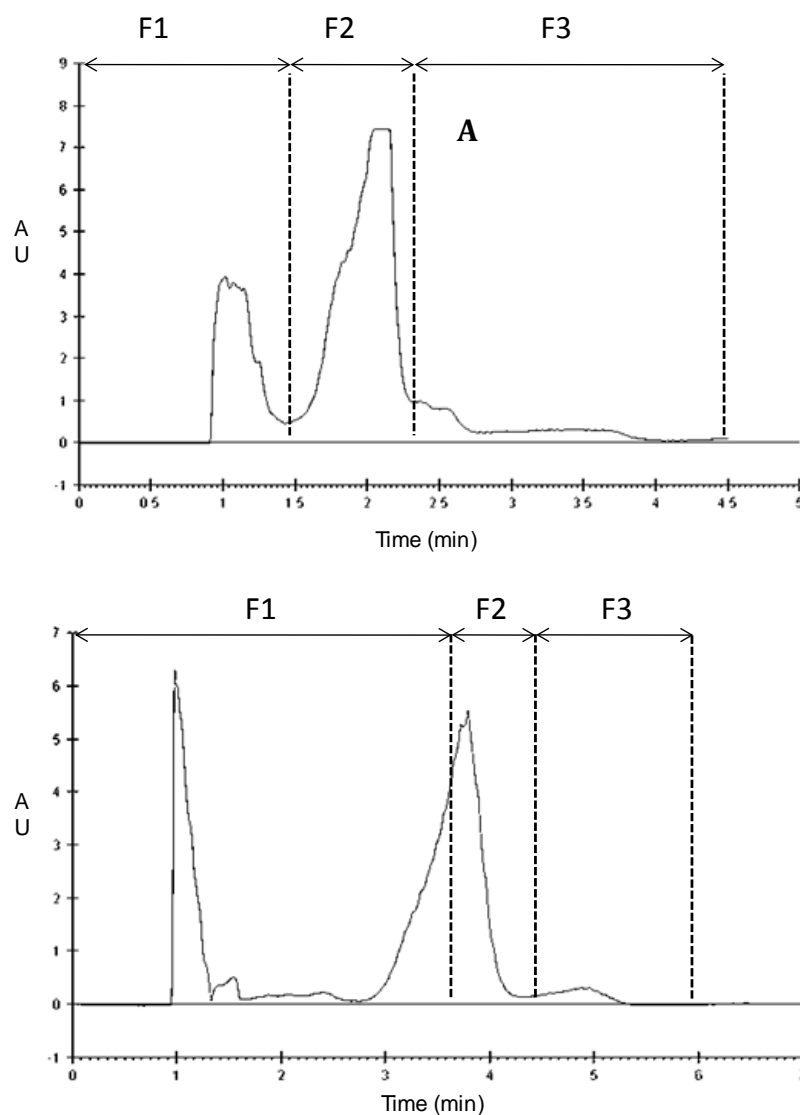
*Fractionation of supercritical rosemary extracts:* The fractionation of SRE was investigated using the PC2 (ACE 5 silica), the PC3 (Viridis SFC silica) and the PC4 (Viridis SFC 2-Ethylpyridine) packed columns. The SRE with different carnosic acid contents referred in Table 1 were used as raw materials and injected in the semi-preparative SFC system. SFC pressure was set to 10 MPa, because high pressures would suppose very short times to obtain different fractions, temperatures in the range of 313-323 K, and the amount of cosolvent employed was varied between 5 and 20 % mass. In all cases, the resolution was satisfactory, but the objective was to obtain one fraction of extract, and the best column was PC4. PC1 column was also tested, (Figure 3) and In all cases, the resolution was satisfactory, but the objective was to obtain one fraction of extract, and the best column was PC4



**Figure 3.** SFC chromatogram of rosemary extract (SRE2-1) using the PC1 (Kromasil 60-DIOL) packed column at 10 MPa, T = 313 K and 20 % mass ethanol.

Table 4 shows the results obtained for the different fractions collected in the assays accomplished with the PC2 column. In each experimental trial, around 20 mg of the extract was injected and separated in three different fractions. As example, Figure 4 shows the intervals of time selected to fractionate the SRE2-1 sample, which contains 20.12 % mass of carnosic acid, using (A) 10 % mass ethanol cosolvent (experiment 2 in Table 4) and (B) 5 % mass of ethanol cosolvent (experiment 3 in Table 4).

As can be clearly deduced from Table 4, the carnosic acid concentration is significantly increased in fraction F2, with a concentration factor (% mass carnosic acid in F2 fraction / % mass carnosic acid in extract) in the range of 1.6 to 1.9. Further, most of the carnosic acid injected in the SFC was recovered in F2 (carnosic acid recovery > 70 %).



**Figure 4.** SFC chromatogram of rosemary extracts using the PC2 (ACE 5 silica) packed column at 10 MPa,  $T = 323$  K and (A) SRE2-1 with 10 % mass of ethanol cosolvent and (B) SRE1 with 5 % mass of ethanol cosolvent. F1, F2 and F3 indicate the intervals of time employed to collect the different fractions in the SFC semi-preparative system.

As mentioned before, experiments 2 and 3 in Table 4 were carried out using the same SRE (20.12 % mass carnosic acid) but applying different amounts of ethanol cosolvent and, consequently, different fractionation intervals of time. Figure 4 shows that the collection of F2 fraction was delayed when 5 % mass of cosolvent is employed (i.e. part of the second peak is collected in F1 fraction). Thus, a higher concentration factor was obtained (1.92 vs. 1.59) but lower carnosic acid recovery was achieved (72.9 % vs. 93.5 %). Further, as expected, the EC<sub>50</sub> value is higher in the F2 fraction in which the 1.92 concentration factor was attained.

**Table 4.** Semi-preparative SFC fractionation of rosemary extracts using PC2 (ACE 5 silica) packed column at 10 MPa and 313 K. CF: concentration factor (% mass carnosic acid in F2 / % mass carnosic acid in extract). F1, F2 and F3: fractions collected (intervals of time are given in Figure 3).

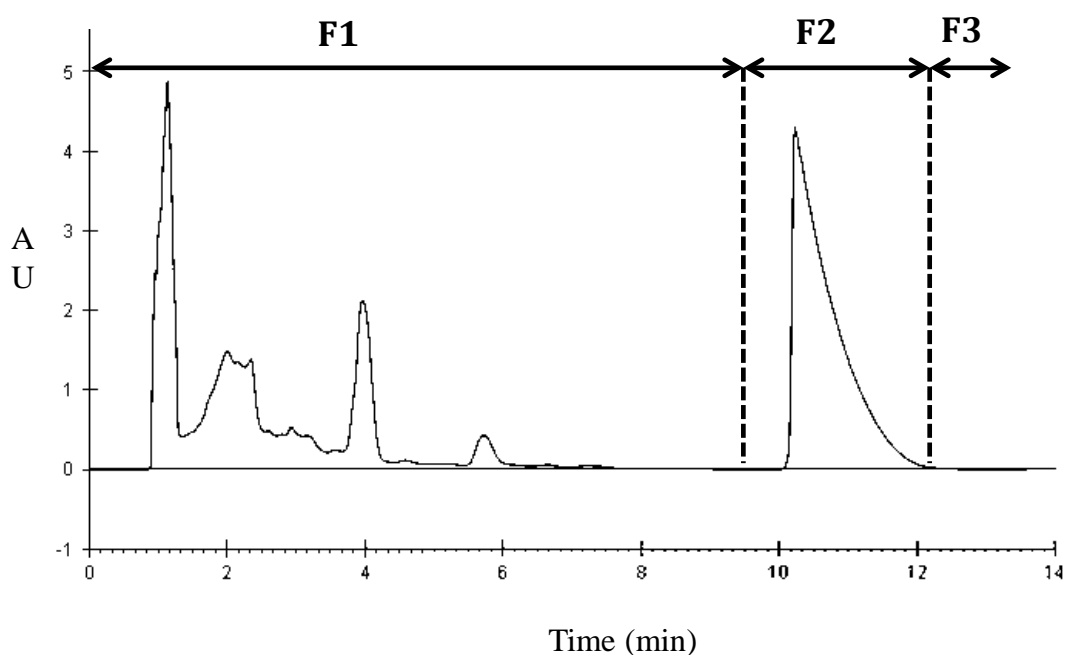
Exp.	% mass of carnosic acid						carnosic acid recovery (%)			CF	EC <sub>50</sub> (µg/mL)
	% ethanol cosolvent		SRE extract	F1	F2	F3	F1	F2	F3	F2	F2
1	10	SRE1	14.44	0.91	25.12	4.56	1.0	96.0	3.0	1.74	12.7
2	10	SRE2-1	20.12	0.46	31.97	10.42	0.7	93.5	5.8	1.59	11.6
3	5	SRE2-1	20.12	7.60	38.59	7.55	21.4	72.9	5.7	1.92	9.5

Similar results were obtained with the PC3 column (Viridis SFC silica) as can be observed in Table 5. Experiments 1 and 2 were carried out using the same supercritical rosemary extract (30.12 % mass of carnosic acid) but applying different amounts of ethanol cosolvent and, consequently, different fractionation intervals of time (see Table 5). Yet again, the carnosic acid concentration was increased in fraction F2 (concentration factors in the range of 1.4 - 1.7) and high carnosic acid recovery was attained in this fraction (> 84 %). As occurred in the SFC-preparative fractionation using PC2 column, the F2 fractions collected present smaller EC<sub>50</sub> values, representing a higher antioxidant activity with respect to the SRE injected in the SFC system.

Despite the carnosic acid concentration of the SRE employed, using PC2 and PC3 columns the % mass of carnosic acid in the F2 fraction was not higher than 55 % (i.e. concentration factors lower than 2). SFC-preparative fractionation using PC4

(Viridis SFC 2-Ethylpyridine) column produced much better results, as depicted in Figure 5 and reported in Table 6. Figure 5 shows the separation attained with the SRE3-1 sample (22.83 % mass carnosic acid) at 10 MPa, 313 K and with 20 % mass ethanol cosolvent. As can be observed in Figure 5, a considerably improved separation of the SRE sample was achieved in comparison with the silica columns. Carnosic acid elution was produced much separated from other peaks, and thus isolation of a fraction with high concentration of carnosic acid was possible.

The concentration factors attained with PC4 column are in the range of 4.4 to 4.6, and almost all the carnosic acid injected in the SFC system was recovered in F2 (carnosic acid recovery > 97 %). F2 fractions were obtained with a % mass of carnosic acid higher than 100. This is due to the lower purity of the carnosic acid standard employed in the HPLC quantification; i.e. the F2 fractions produced with the PC4 column have higher % mass concentration of carnosic acid than the commercial standard employed for analysis.



**Figure 5.** SFC chromatogram of sample SRE3-1 using PC4 (Viridis SFC 2-Ethylpyridine) column at 10 MPa, 323 K and 20 % mass ethanol cosolvent. F1, F2 and F3 indicate the intervals of time employed to collect the different fractions in the SFC semi-preparative system.



Figure 6 shows the EC<sub>50</sub> values of all SRE (S1 and S2 samples of Table 1) and all F2 fractions (Tables 4 to 6) produced as a function of the content (% mass) of carnosic acid. As can be observed from the figure a high correlation ( $R^2 = 0.988$ ) between the EC<sub>50</sub> values and the % mass of carnosic acid was obtained in a log-log basis, indicating the major effect of carnosic acid in the antioxidant activity of rosemary extracts.

The purity fraction of carnosic acid obtain was testd by UPLC-MS/MS and the results confirmate that te compound was carnosic acid.

**Table 5.** Semi-preparative SFC fractionation of rosemary extracts using PC3 (silica) packed column at 10 MPa and 313 K. CF: concentration factor (% mass carnosic acid in F2 / % mass carnosic acid in extract). F1, F2 and F3: fractions collected. N.I.: non-identified.

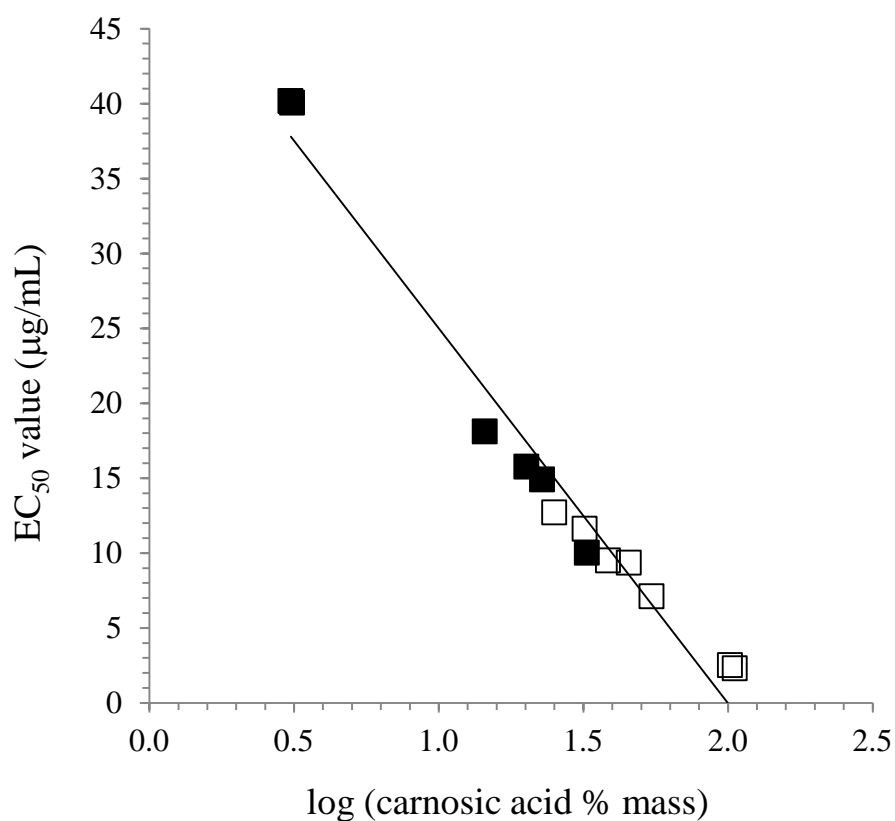
Exp.	% mass of carnosic acid						carnosic acid recovery (%)			CF	EC <sub>50</sub> (µg/mL)
	% ethanol cosolvent	SRE extract	F1	F2	F3		F1	F2	F3	F2	F2
1 <sup>a</sup>	5	SRE4	32.60	2.65	45.43	16.34	3.68	84.1	12.19	1.39	9.34
2 <sup>b</sup>	10	SRE4	32.60	N.I.	54.56	10.11	N.I.	88.7	11.30	1.67	7.11

<sup>a</sup> F1: (0-3.3min); F2: (3.3-5.3 min); F3: (5.3-7.2 min).

<sup>b</sup> F1: (0-1.3min); F2: (1.3-2.5 min); F3: (2.5-4.5 min).

**Table 6.** Semi-preparative SFC fractionation of rosemary extracts using PC4 () packed column at 10 MPa and 313 K. CF: concentration factor (% mass carnosic acid in F2 / % mass carnosic acid in extract). F1, F2 and F3: fractions collected. F1: (0-9.3min); F2: (9.3-12.5 min); F3: (12.5-13.5 Min). N.I.: non-identified.

Exp.	% mass of carnosic acid						carnosic acid recovery (%)			CF	EC <sub>50</sub> (µg/mL)
	% ethanol cosolvent	SRE extract	F1	F2*	F3		F1	F2	F3	F2	F2
1	20	SRE3-1	22.83	0.53	101.72	N.I.	1.78	98.21	N.I.	4.46	2.5
2	20	SRE3-1	22.83	0.82	105.82	N.I.	2.67	97.32	N.I.	4.64	2.3



**Figure 6.** Correlation between EC<sub>50</sub> values (µg/ mL) and carnosic acid content (CA % mass) of all supercritical rosemary extracts (SRE) produced (Table 1) and F2 fractions obtained in the semi-preparative SFC system (Tables 4 to 6):  $EC_{50} = -25.026 \cdot \log (CA \% \text{ mass}) + 50.027$  ( $R^2 = 0.971$ ).

## Conclusions

Carnosic acid is recognized as one of the major antioxidant substances present in rosemary leaves. In this work, supercritical fluid extraction of rosemary was applied to obtain extracts concentrated in this antioxidant. Then, carnosic acid was isolated from these samples using a SFC-semipreparative system, and achieving purity close to 100 % and high recovery (> 97 %). To attain this target different chromatography (HPLC and specifically designed SFC columns) were employed. Around 20 mg of supercritical rosemary extracts were fractionated using the different columns at 10 MPa, temperatures of 313 and 323 K, and using 5-20 % mass ethanol cosolvent. Viridis SFC 2-Ethylpyridine column exhibited the best performance with concentrations factors around 4.5, followed by the silica packed columns (Viridis SFC silica and ACE 5 silica), which presented similar behavior (concentration factors lower than 2). As you can see the supercritical fluid chromatography is a rapid method serparación and representing a minimum expenditure of solvents Further, it was demonstrated that the higher the carnosic acid content in the isolated fraction the lower its EC<sub>50</sub> value (higher antioxidant capacity), obtaining a linear relation in a log-log representation over a large range of carnosic acid concentrations (3-100 % mass).

## Acknowledges

This work has been financed by project AGL2010-21565 (subprogram ALI) and project INNSAMED IPT-300000-2010-34 (subprogram INNPACTO) from Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain).



# DISCUSIÓN GENERAL



## 6. Discusión general

### 6.1 Extracción supercrítica y aplicaciones de los extractos de romero

Como se ha comentado en las secciones anteriores de esta memoria, existe hoy en día una gran preocupación por el binomio salud-alimentación. Esto hace que se trabaje intensamente en el campo de la investigación y de la industria para desarrollar nuevos ingredientes y alimentos funcionales, que ayuden al ser humano a conseguir una dieta saludable que le permita reducir el riesgo de padecer ciertas enfermedades. En esta tesis doctoral se ha intentado llevar a cabo el desarrollo, a partir de la matriz vegetal del romero (*Rosmarinus Officinalis*) y mediante la utilización de una tecnología limpia y verde como son los fluidos supercríticos, un extracto funcional que pueda aplicarse en el campo de la alimentación y de la biomedicina. Para llevar a cabo este objetivo se estudió la extracción supercrítica de hojas de romero y como afectan las variables del proceso en los extractos obtenidos. Así mismo se estudió la concentración de los compuestos de interés mediante cromatografía supercrítica y las posibles aplicaciones de los extractos obtenidos.

Si bien la SFE de romero ha sido estudiada por numerosos autores, en esta tesis se analizó la cinética de la extracción, incluyendo la modelización teórica del proceso, con el objetivo de llevar a cabo el correcto escalado hacia una celda de extracción de 2 litros, que permite procesar 500-600 gramos de hojas de romero molidas y tamizadas, apuntando a la producción industrial del extracto antioxidante.

En el artículo "*Kinetic study of pilot-scale supercritical CO<sub>2</sub> extraction of Rosemary (Rosmarinus Officinalis) Leaves*", en las dos cinéticas realizadas, una sin fraccionamiento (E1) y otra con fraccionamiento (E2), se observó que a medida que aumenta el tiempo de extracción, aumenta la cantidad de ácido carnósico recogido. En E2, el fraccionamiento produjo una precipitación selectiva del ácido carnósico en el primer separador, lo que se corresponde con trabajos realizados por otros autores (Ibáñez y col., 1999; Ivanovic y col., 2009). El contenido en ácido carnósico determinado en las distintas fracciones (recogidas a intervalos regulares de tiempo durante el estudio cinético E1) se relacionó directamente con la actividad

antioxidante, y esta fue más elevada cuanto mayor fue el contenido de ácido carnósico en la correspondiente fracción. Estos resultados se corresponden también con la literatura, y diversos trabajos publicados sobre la actividad antioxidante de algunos compuestos fenólicos del romero, en especial el ácido carnósico (Erkan y col., 2008; Costa y col., 2007).

Así mismo, los estudios cinéticos permitieron determinar que, después de cierto tiempo, la matriz vegetal queda agotada de los componentes del aceite esencial y, por lo tanto, la concentración de antioxidantes en las fracciones recogidas aumenta con el tiempo de extracción. Por ejemplo, se observó que durante el período de 3- 4,5 h en E2, mediante el fraccionamiento del material extraído, se obtiene una fracción (2,22 g) con 19 % en peso de ácido carnósico en el primer separador. Sin embargo, esta concentración de ácido carnósico también se obtiene en una extracción sin fraccionar (E1), durante el período de 4-6 h, y con rendimiento significativamente mayor (4,72 g). Esto demuestra que después de cierto tiempo de extracción, los componentes del aceite esencial fueron eliminados casi completamente de la matriz vegetal y, por lo tanto, la concentración de antioxidantes aumenta en el extracto y el fraccionamiento sólo produce una disminución de rendimiento.

Sobre la base de estas observaciones, se desarrolló un esquema de fraccionamiento, variable en el tiempo, con el objetivo de maximizar el rendimiento de producción de un extracto con buena actividad antioxidante, y obtenido sin utilizar co-solvente. Con miras a la producción industrial de extracto supercrítico de romero, evitar el uso de co-solvente implica una gran ventaja puesto que se eliminan los grandes costes involucrados en la separación del co-solvente, tanto en el sistema de recirculación de disolvente como para la obtención del producto seco.

El estudio de fraccionamiento llevado a cabo en el segundo trabajo expuesto en la sección 5.1, *Supercritical fractionation of Rosemary extracts to improve the antioxidant activity*, permitió desarrollar un nuevo esquema de extracción en el cual el fraccionamiento del extracto se mantiene sólo durante cierto período de tiempo. Durante este periodo se produjo una fracción antioxidante en el primer separador, mientras que el aceite esencial de romero precipitó mayoritariamente en el segundo separador. Una vez que la matriz vegetal se hubo agotado de las sustancias más volátiles y solubles en CO<sub>2</sub>, se detuvo el fraccionamiento y todo el material extraído



precipitó en el primer separador, mezclándose con la fracción antioxidante precipitada durante la etapa de fraccionamiento.

Realizando este proceso, se obtuvo una fracción con el doble de contenido de ácido carnósico en comparación con el producto sin fraccionar. Además, el rendimiento fue el doble del obtenido cuando se mantuvo el fraccionamiento durante todo el tiempo, manteniéndose un porcentaje de ácido carnósico similar.

Manteniendo el fraccionamiento durante una hora, el rendimiento en S1 es casi el doble que fraccionando durante dos horas, con un contenido de ácido carnósico similar.

Teniendo en cuenta los resultados observados en estos dos primeros trabajos, las condiciones óptimas que se seleccionaron para el proceso de extracción y fraccionamiento (llamado PR1) se muestra en la siguiente tabla:

**Tabla 6.1.** Condiciones óptimas de extracción y fraccionamiento de romero (PR1).

<b>Matriz vegetal: Romero en hojas</b>	Masa	500 g
	Tamaño partícula	200-500 $\mu\text{m}$
<b>Presión celda de extracción</b>	30 MPa	
<b>Temperatura celda de extracción</b>	40 °C	
<b>Flujo de CO<sub>2</sub></b>	60 g/min	
<b>Co-solvente</b>	No	
<b>Tiempo total de extracción</b>	6 horas	
<b>Tiempo de fraccionamiento</b>	1 hora	
	Condiciones S1	10 MPa y 40°C
	Condiciones S2	5 MPa, 30°C

El flujo de CO<sub>2</sub> se incrementó de 2,4 a 3,6 Kg/h con el fin de aumentar el rendimiento y acelerar la cinética de extracción.

Aplicando estas condiciones se obtuvo en el primer separador un extracto de romero supercrítico con un rendimiento medio del 3 %, con la caracterización química que se muestra en la Tabla 6.2, y con una actividad antioxidante de EC<sub>50</sub> = 15

µg/mL, medida según el método del DPPH. El extracto obtenido en las condiciones de operación PR1 ha sido aplicado en el grupo de investigación, como componente antioxidante, en la formulación de varios ingredientes alimentarios funcionales en el contexto de diferentes proyectos y contratos de investigación.

**Tabla 6.2.** Componentes principales (% peso) del extracto supercrítico de romero obtenido en las condiciones PR1: componentes del aceite esencial analizados por GC-MS y compuestos fenólicos analizados por (HPLC).

	% en peso
<b><i>Aceite esencial (componentes claves)(GC-MS)</i></b>	
1,8-cineol (eucaliptol)	8.76
Alcanfor	3.26
Borneol	0.79
Verbenona	0.56
Acetato de bornilo	0.23
<i>Otros componente, principalmente monoterpenos (&lt; 1 % en peso)</i>	≈ 20
<b><i>Compuestos fenólicos (HPLC)</i></b>	
Ácido carnósico	18
Carnosol	1,6

Las cinéticas de extracción estudiadas, a 30 MPa y 40°C, mostraron la evidencia de que el principal antioxidante estudiado (ácido carnósico) no había sido agotado de la matriz vegetal, aún después de 8 h de extracción. Por ello, se llevaron a cabo nuevos ensayos aumentando la presión de extracción a 40 y 45 MPa, sin variar el tiempo de extracción, pero no se logró un aumento significativo ni del rendimiento de extracción ni de la concentración de ácido carnósico en el extracto. Por otro lado, en los análisis del extracto de romero obtenido mediante PR1 no se detectó la presencia de ácido rosmarínico, otro compuesto importante presente en el romero que posee una elevada actividad como antioxidante y es extraído del romero cuando se utilizan disolventes líquidos polares (Petersen y Simmonds., 2003).

Esta fue una de las razones por las que se exploró el empleo de etanol como co-solvente de extracción supercrítica, para intentar producir un extracto con mayor contenido de antioxidantes, en general, y con ácido rosmarínico en particular. Las condiciones de extracción con etanol como co-solvente y las características de los extractos obtenidos que se describen en el trabajo “*Supercritical Rosemary extracts as antioxidant for use in edible vegetable oil*” se muestran en la siguiente tabla (Tabla 6.3.).

**Tabla 6.3.** Rendimientos de extracción SFE (g extracto/g hojas romero x100), contenido en ácido carnósico y contenido en los principales compuestos volátiles utilizados en el trabajo: “*Supercritical Rosemary extracts as antioxidant for use in edible vegetable oil*”.

Muestra	Condiciones	Rendimiento <sup>a</sup>	Ácido carnósico (% w/w) <sup>b</sup>	Principales volátiles (% w/w) <sup>c</sup>
M1	30 MPa, 40 °C, 360 min.	4.52 ± 0.17	10.89	12.79
M2-1	30 MPa, 40 °C. 360 min	2.83 ± 0.18	16.90	13.59
M2-2	Fraccionamiento en línea 60 min.	1.53 ± 0.22	3.12	21.70
M3	15 MPa, 40 °C. 5 % etanol. 180 min.	7.26 ± 0.27	25.66	10.42
M4	15 MPa, 40 °C. 10 % etanol. 180 min.	13.44 ± 0.32	14.18	4.69
M5-1	15 MPa, 40 °C. 1 etapa: No etanol (60 min).	1.42 ± 0.30	2.00	36.92
M5-2	2 etapa 10 % etanol (120 min)	3.02 ± 0.19	28.49	4.81
M6	15 MPa, 40 °C, 180 min. 10 % etanol. Material de partida extracción 1 (M1)	4.93 ± 0.25	30.69	2.04

<sup>a</sup> desviación estándar < 0.24

<sup>b</sup> valores reportados correspondientes a la media entre dos duplicados. Desviación estándar < 0.53

<sup>c</sup> valores reportados correspondientes a la media entre dos duplicados. Desviación estándar < 0.41

En este trabajo se muestra en general que, en aquellas extracciones que han sido llevadas a cabo con etanol como modificador, se obtuvieron mayores rendimientos y mayores cantidades de ácido carnósico. Sin embargo, la extracción en la que se obtuvo el mayor rendimiento (extracción 4, 13,44 %) no corresponde con las muestras que tienen mayor contenido en ácido carnósico. Esto puede deberse a la co-extracción de un gran número de compuestos al emplear una elevada cantidad de co-solvente (10%) y por tanto a la dilución del compuesto de interés.

Sin embargo, si se observan las condiciones de M6, aunque se utilizó un porcentaje de etanol elevado, los resultados en cuanto a rendimientos fueron menores, ya que en este caso se partió de una matriz que había sido previamente extraída con CO<sub>2</sub> supercrítico durante 6 horas (materia residual de la producción de M1). Los resultados muestran que una etapa previa de extracción sin utilizar co-solvente favorece, en una posterior extracción con etanol, la obtención de un extracto rico en ácido carnósico. Sin embargo, disminuyendo la cantidad de modificador (5 %) con solo una etapa de extracción de la matriz original (M3) se consiguieron resultados similares en composición de ácido y con un rendimiento mucho mayor, 7,26 frente a 4,93 %. La principal diferencia entre estas dos muestras se debe al contenido de aceite esencial: mientras que M6 se encuentra prácticamente desodorizada (2,04 % aceite esencial), la muestra M3 contiene una cantidad mayor de aceite esencial (10,42 %).

La composición de la M5-2 y M6 muestra un resultado similar en cuanto al ácido carnósico ya que ambas han seguido el mismo esquema de extracción, una extracción previa sin modificador y una segunda etapa con modificador, aunque la M5-2 se realizó con tiempos menores de extracción. La muestra M5-1 es la que presenta con diferencia un mayor contenido de aceite esencial (36,92 %), verificando el trabajo de otros autores (Fornari y col., 2012) que señalan que los aceites esenciales se extraen fácilmente a presiones moderadas y en las primeras etapas del proceso.

Resulta interesante comparar la extracción supercrítica de romero con disolventes con otras técnicas de extracción que también lo utilizan. Aunque en los trabajos expuestos en esta tesis no se incluye ninguno en el que se compara la

extracción de hojas de romero con distintas tecnologías, si se han realizado diferentes pruebas en el laboratorio. En la Tabla 6.4 se muestran los resultados obtenidos.

**Tabla 6.4.** Comparativa de diferentes técnicas de extracción de hojas de romero con empleo de etanol como disolvente. Rendimiento de extracción, masa de ácido carnósico y consumo de etanol por g de planta.

	CO <sub>2</sub> (g/min)	etanol	T (°C)	P (bar)	tiempo	total ácido carnósico (mg/g planta)	etanol (ml /g planta)	mg ácido carnósico/ ml etanol
<i>SFE a partir de hojas de romero</i>								
1	60	10 %	40	150	3 h	19.05	2.7	7.1
2	60	5 %	40	150	3 h	18.63	1.35	13.8
3	60	-	40	300	6 h	4.92	no etanol	
4	60	-	40	300	6 h (1 h fraccionamiento)	5.26	no etanol	
<i>SFE a partir de la matriz vegetal (hojas de romero) desodorizada</i>								
5	60	10 %	40	150	3 h-Ext 3	15.13	2.7	
6	60	10 %	40	150	3 h-Ext 4	16.41	2.7	6.1
<i>ASE de hojas de romero utilizando etanol</i>								
7			150	115	10 min	21.23	20	1.1
8			150	115	20 min	29.63	20	1.5
<i>ESL de hojas de romero utilizando etanol</i>								
10			50	1	24 h	25.54	100	0.3

Comparando los resultados de la tabla, en las extracciones supercríticas la cantidad de ácido carnósico extraído por gramo de planta es mayor cuando se emplea co-solvente en la extracción ( $\approx 19$  mg frente a 5mg). No obstante, Arouma y col. (1992) reportan un contenido de ácido carnósico y carnosol en las hojas de romero de aproximadamente 50 mg/g planta, lo que parece indicar que, aun utilizando co-solvente, quedan cantidades importantes de antioxidantes sin extraer en la matriz vegetal. Esto se corrobora con los resultados de las extracciones ASE que llegan a obtener hasta 29 mg de ácido carnósico/g planta o con la extracción sólido-líquido, hasta 25 mg ácido carnósico, pero con un consumo muy elevado de etanol, con las desventajas que esto conlleva.

Los estudios llevados a cabo al añadir etanol como co-solvente en SFE de hojas de romero, permitieron obtener un abanico de extractos, con diferentes

composiciones y actividad antioxidante (Tabla 6.3). Algunos de estos extractos fueron seleccionados para estudiar su efecto al adicionarse como conservante de aceites comestibles (“*Supercritical Rosemary extracts as antioxidant for use in edible vegetable oil*”) y su efecto en la actividad antiproliferativa sobre células cancerígenas hepáticas “*Supercritical rosemary extracts, their antioxidant activity and effect on hepatic tumor progression*”.

Dentro de este abanico de extractos obtenidos resultó particularmente interesante en las dos aplicaciones seleccionadas la muestra M6, cuya caracterización química se muestra en la Tabla 6.5 y con una actividad antioxidante de  $EC_{50} = 9.8 \mu\text{g/mL}$ , medida según el método del DPPH.

**Tabla 6.5.** Composición química (% peso) del extracto supercrítico de romero M6: componentes del aceite esencial determinados por GC-MS y compuestos fenólicos determinados por HPLC y relación entre los antioxidantes y los compuestos volátiles principales.

	% en peso
<b>Principales volátiles</b>	<b>2.04</b>
1,8-cineol (eucaliptol)	
Alcanfor	
Borneol	
Verbenona	
Acetato de bornilo	
<b>Compuestos fenólicos (HPLC)</b>	
Ácido carnósico	30,69
Carnosol	2,56
Ácido carnósico + Carnosol	33,25
<b>Relación antioxidantes / p. volátiles</b>	<b>16,29</b>

La muestra M6 es el resultado de una segunda extracción llevada a cabo con etanol después del proceso PR1. Las condiciones de este proceso que se denomina PR2 se describen en la Tabla 6.6.

**Tabla 6.6.** Condiciones de extracción de PR2.

<b>Matriz vegetal:</b> Hojas de romero extraído con PR1	Masa	500 g
	Tamaño partícula	200-500 $\mu\text{m}$
<b>Presión celda de extracción</b>	15 MPa	
<b>Temperatura celda de extracción</b>	40 °C	
<b>Flujo de CO<sub>2</sub></b>	60 g/min	
<b>Co-solvente</b>	10% v/v	
<b>Tiempo total de extracción</b>	180 min	
<b>Tiempo de fraccionamiento</b>	no	
	Condiciones S1	5 MPa, 40°C
	Condiciones S2	5 MPa, 30°C

De acuerdo con la Directiva 2010/67/EU, para autorizar un extracto supercrítico de romero como aditivo E-392, es necesario un contenido en ácido carnósico+carnosol superior a 13 % en peso y una relación entre estos antioxidantes y los principales componentes del aceite esencial (volátiles claves: 1,8 cineol, alcanfor, borneol, verbenona y bornil acetato) superior a 15. El extracto obtenido bajo las condiciones de operación PR2 cumple con la Directiva 2010/67/EU de 20 de Octubre de la Comisión Europea y, por lo tanto puede ser utilizado en forma comercial como conservante alimentario.

Para llevar a cabo los estudios de estabilidad oxidativa con tres aceites vegetales (sésamo (AcS), pepita de uva (AcU) y lino (AcL)) se seleccionaron los extractos que se muestran en la siguiente tabla (Tabla 6.7).

**Tabla 6.7.** Extractos supercríticos de romero utilizados para estudiar la estabilidad oxidativa de aceites comestibles.

Muestra	Condiciones	Rendimiento extracción (%)	EC <sub>50</sub> (µg/ml)	Ácido carnósico + carnosol (% en peso)	Relación ácido carnósico + carnosol / aceite esencial
M1	30 MPa, 40°C, 60 g/min CO <sub>2</sub> , 6 h de extracción, sin co-solvente, sin fraccionamiento	4,52	32,97	11,99	0,93
M2-1	PR1	2,83	15,91	18,80	1,38
M6	PR2	4,93	9,8	33,25	16,29

La determinación de la estabilidad oxidativa de los aceites comestibles en ausencia de extracto de romero siguió el siguiente orden: AcS > AcU > AcL. Es decir, el aceite de lino resultó ser el aceite más inestable, tal y como se esperaba debido a su composición.

La cantidad y la composición del extracto que se añade a un aceite vegetal para producir un efecto antioxidante es un aspecto fundamental a tener en cuenta ya que puede afectar tanto su solubilización en el aceite como alterar el aroma original del aceite de partida. En este sentido, el extracto M6 presenta ventajas frente a los otros debido a la mayor relación antioxidantes/aceite esencial.

Los tres extractos se adicionaron en tres concentraciones diferentes (100, 200 y 300 mg de extracto/kg de aceite). En general, se observó que a mayor nivel de adición mayor es el índice de actividad antioxidante (IAA), independientemente del extracto utilizado. Sin embargo, la magnitud del IAA fue diferente en función del extracto añadido.

El extracto M6 fue el más efectivo en todos los casos, permitiendo alcanzar el mismo efecto antioxidante pero en concentraciones más bajas que M1 y M2-1. En el caso del AcL, es necesario añadir 100 mg/kg de M6 para obtener un IAA cercano a 2, mientras que se necesitan 200 mg/kg de M2-1 ó 300 mg/kg de M1 para obtener el mismo efecto (Figura 1 del trabajo “*Supercritical carbon dioxide extraction of antioxidants from rosemary (Rosmarinus officinalis) leaves for use in edible vegetable oils*”). Así, con M6, se añaden 33,25 mg de ácido carnósico y carnosol por kg de aceite,



cantidad muy próxima a los valores máximos admitidos para el E-392 (30 mg de ácido carnósico y carnosol por kg de aceite).

Por otro lado, la adición de diferentes extractos de romero produjo distintos efectos en función del tipo de aceite. El mayor aumento de la estabilidad oxidativa se produjo en el AcL, tal como se esperaba en función de su estabilidad sin extracto añadido. Sin embargo, comparando el AcS y el AcU se observó un efecto contrario, siendo mayor en el AcS. Este resultado puede ser debido a la relación ácidos poli-insaturados n-6/ácidos saturados de los aceites: 5,7 para el AcU, 3,1 para el AcS y 2,1 para el AcL. Es decir, la presencia de grandes concentraciones de ácidos n-6 en el aceite puede limitar la actividad antioxidante de los extractos de romero supercrítico sobre ellos y su estabilidad frente a la oxidación.

En el estudio del efecto antiproliferativo sobre células cancerígenas hepáticas se seleccionaron extractos con contenidos crecientes de ácido carnósico, tal como se muestra en la Tabla 6.8.

**Tabla 6.8.** Extractos supercríticos de romero utilizados para estudiar su potencial efecto antiproliferativo sobre células cancerígenas hepáticas.

Extracto	Rendimiento extracción (%)	EC <sub>50</sub> (µg/ml)	Ácido carnósico (% en peso)	Aceite esencial (% peso)
1 30 MPa, 40°C, 60 g/min CO <sub>2</sub> , 6 h de extracción, sin co-solvente, sin fraccionamiento	4,52	32,97	10,89	12.79
2 PR1	2,83	15,91	16,90	13.59
3 15 MPa, 40°C, 60 g/min CO <sub>2</sub> , 3 h de extracción, 5 % etanol co-solvente, sin fraccionamiento	7,26	14,77	25,66	10.42
4 PR2	4,93	9,8	30,69	2.04

La aplicación de los extractos descritos en la Tabla 6.8 sobre células cancerígenas hepáticas mostró capacidad antiproliferativa positiva. Teniendo en cuenta la composición de los extractos parece posible que el ácido carnósico pueda ser uno de los principales responsables de esta actividad ya que la reducción de la

actividad proliferativa fue mayor cuanto mayor fue la concentración de ácido carnósico en la muestra (extractos 1, 2 y 3 en la Tabla 6.8). Sin embargo, en el extracto 4, el cual tiene el mayor contenido en ácido carnósico, se observó una inversión de la tendencia, mostrando un efecto antiproliferativo incluso inferior al que se encontró con el extracto 3. Este resultado plantea la posibilidad de una contribución a la actividad antiproliferativa del extracto no sólo de los compuestos antioxidantes (principalmente ácido carnósico) sino también de alguno/algunos de los componentes del aceite esencial (efecto sinérgico) puesto que, mientras los extracto 1 a 3 tienen todos un contenido de aceite esencial muy cercano a 12 %, el extracto 4 está prácticamente desodorizado (aceite esencial  $\approx$  2 % en peso).

## 6.2. Purificación de ácido carnósico por cromatografía supercrítica

De los resultados planteados en la sección anterior el ácido carnósico parece ser uno de los principales responsables de la actividad antioxidante y antiproliferativa de los extractos de romero obtenidos en las diferentes condiciones de extracción, presión, temperatura, con y sin empleo de co-solventes. Por ello se planteó el aislamiento del ácido carnósico utilizando la cromatografía supercrítica semi-preparativa.

El estudio previo realizado sobre el fraccionamiento de un extracto de tomillo supercrítico permitió conocer el equipo experimental, establecer sus límites de trabajo (especialmente establecer una escala semi-preparativa viable), facilidades del sistema de recogida de fracciones, etc. con resultados satisfactorios en cuanto a recuperación y concentración del principal componente antimicrobiano del extracto (timol). Después de establecer las condiciones óptimas de elución, el extracto se separó en tres fracciones, conteniendo la segunda un 51,4 % de timol (1,7 veces la concentración inicial) y recuperándose en dicha fracción un 97,2 % del total de timol inyectado. Este estudio preliminar realizado sobre el tomillo, permitió la planificación del trabajo con el romero para conseguir el objetivo propuesto, concentración del ácido carnósico.

La purificación del ácido carnósico de los extractos de romero comenzó con el estudio del efecto de las diferentes condiciones de operación, presión y temperatura y sobre la elución de un patrón de ácido carnósico. Se empleó también un % etanol puesto que, como se esperaba, cuando no se utilizó co-solvente, debido a la baja solubilidad del ácido carnósico en CO<sub>2</sub> puro, las presiones estudiadas no fueron suficientes para eluir el patrón del sistema cromatográfico. Estos mismos resultados fueron obtenidos por Ramírez y col., 2004 con ensayos a nivel analítico y por Ramírez y col., 2006 en estudios de la elución del ácido carnósico a escala semipreparativa, en los que fue necesaria la aplicación de presiones muy elevadas, del orden de 37 MPa para conseguir la elución del compuesto sin el empleo de co-solvente. Como era de esperar los tiempos de retención disminuyeron con la presión y con el co-solvente utilizado pero aumentaron a medida que se incrementaba la temperatura.

Una vez comprobada la respuesta del ácido carnósico frente a la Presión, temperatura y % de etanol se analizaron los extractos supercríticos de romero en diferentes columnas. La primera fue una columna SFC de sílice. Se probaron diferentes condiciones y se seleccionó la presión (10 MPa) y T (40 °C) como condiciones óptimas para llevar a cabo posteriormente un fraccionamiento del extracto supercrítico de romero. La reproducibilidad de la columna después de la inyección de diez veces el extracto fue óptima para continuar con el estudio. El fraccionamiento se realizó empleando dos porcentajes de co-solvente (5 y 10 %) para comparar dos diferentes intervalos de fraccionamiento. En el primer caso (5 % de etanol) se recogieron tres fracciones: F1 (0 - 3,3 min), F2: (3,3 - 5,3 min) y F3 (5,3 - 7,2 min). En la segunda fracción de este ensayo se obtuvo una concentración de ácido carnósico de un 45,43 %, lo que supone un factor de concentración de 1,4 veces respecto al extracto de partida que presentaba un contenido de 32,6 % de ácido carnósico. Además se recuperó el 84,1 % del total de ácido carnósico inicial. En esta fracción también se midió la actividad antioxidante por el método DPPH obteniendo un valor de EC<sub>50</sub> de 9,34 µg/mL. En el segundo ensayo (10 % de etanol) se redujeron los tiempos en el fraccionamiento: F1 (0 - 1,3 min), F2 (1,3 - 2,5 min) y F3 (2,5 - 4,5 min) y se obtuvo en la segunda fracción una concentración de ácido carnósico de 54,56 %. El factor de concentración respecto al extracto de partida fue 1,67, la recuperación del 88,7 % del total de ácido carnósico y el valor EC<sub>50</sub> de la fracción de 7,11 µg/mL.

La segunda columna elegida fue una columna convencional de HPLC de sílice, en lugar de una con empaquetamiento especial para SFC. Se probaron las mismas condiciones que la columna anterior, la reproducibilidad de la columna y se realizaron tres diferentes fraccionamientos del extracto. Los dos primeros fueron realizados a 10 MPa, 40°C y 10 % de etanol, pero partiendo de extractos supercríticos de romero con diferente concentración de ácido carnósico (14,44 y 20,12%). En los dos casos los intervalos de fraccionamiento fueron, F1 (0-1,5 min), F2 (1,5-2,3 min) y F3 (2,3-4,5 min). En la fracción 2 del primer ensayo se llegó a una concentración del 25,12 %, una recuperación de ácido carnósico del 96 % y un factor de concentración de 1,74. La actividad antioxidante de esta segunda fracción también se midió mediante el método DPPH, obteniendo un valor EC<sub>50</sub> de 12,7 µg/mL. En la fracción 2 del segundo ensayo se concentró la muestra 1,59 veces, lo que supuso una fracción

con un 31,97 % de ácido carnósico. El porcentaje de recuperación fue de 93,5 % y el valor  $EC_{50}$  11,67  $\mu\text{g/mL}$ .

En el tercer fraccionamiento se modificó el porcentaje de co-solvente, utilizando un 5 %. Además con el objetivo de obtener una fracción más concentrada en ácido carnósico que en los ensayos anteriores se variaron los tiempos del esquema del fraccionamiento. En este caso las fracciones fueron F1 (0-3,6 min), F2 (3,6 - 4.5 min) y F3 (4,5 - 6 min) (Figura 4 del trabajo "*Isolation of carnosic acid by supercritical  $CO_2$  chromatography from rosemary extracts.*"). El extracto de partida fue el mismo que el del segundo ensayo, y se obtuvo una fracción con un 38,59 % de ácido carnósico. En este caso el porcentaje de recuperación de ácido carnósico disminuyó hasta un 72,9 %, pero el factor de concentración y el valor  $EC_{50}$  mejoraron: 1,92 y 9,5  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente.

Aunque con las dos columnas de sílice estudiadas los resultados obtenidos nos permitían conseguir fracciones con una mayor concentración de ácido carnósico y por tanto una mayor capacidad antioxidante que los extractos de partida, la concentración máxima fue de 54,56 %. En vistas a mejorar este porcentaje, se probaron otras columnas con una química diferente. Los resultados obtenidos con una columna diol fueron muy poco satisfactorios en cuanto a la resolución, sin embargo no ocurrió lo mismo con una columna Viridis SFC 2-etilpiridina. En esta columna se mantuvieron las variables de presión y temperatura de los ensayos anteriores pero se ajustó el % de co-solvente hasta el 20 %. Este aumento de etanol se debe a que el relleno de esta columna tiene una polaridad diferente a la sílice y es necesario aumentar la polaridad de la fase móvil para eluir el compuesto. A pesar de que el tiempo de análisis aumentó, se pudo mejorar la separación del ácido carnósico y el carnosol, que eluían con tiempos de retención demasiado próximos en las columnas anteriores para poder realizar un correcto fraccionamiento a escala semipreparativa (Figura 2 del trabajo "*Isolation of carnosic acid by supercritical  $CO_2$  chromatography from rosemary extracts*")

En esta columna se realizó un fraccionamiento con los siguientes intervalos de tiempo: F1 (0 - 9,3 min), F2 (9,3 - 12,5 min) y F3 (12,5 - 13,5 min). El contenido en ácido carnósico se concentró en F2 de 22,83 hasta 101,72%, es decir, un factor de concentración de 4,46 y un porcentaje de recuperación de 98,21 %. Se realizó un

segundo ensayo en las mismas condiciones y se obtuvo una fracción con un 105,82 % de ácido carnósico, lo que supone de nuevo un factor de concentración de 4,64. El porcentaje de recuperación también fue muy elevado, 97,32 %.

El hecho de que se obtengan fracciones superiores al 100 % se puede deber a que el cálculo de la concentración de ácido carnósico se realiza en base a un patrón comercial con pureza de 91%. La fracción F2 obtenida es por tanto comparable con el patrón comercial.

La fracción F2 obtenida se analizó mediante LC-MS y se verificó la pureza del extracto obtenido por SFC.

Las condiciones óptimas del proceso cromatográfico desarrollado (PR3) para elaborar aislar ácido carnósico se pueden ver en la Tabla 6.9.

**Tabla 6.9.** Condiciones de extracción PR3.

<b>Columna cromatográfica</b>	Viridis SFC2-Etilpiridina
<b>Concentración de la muestra</b>	5 mg/ml en cloroformo
<b>Presión celda del sistema</b>	10 MPa
<b>Temperatura</b>	40 °C
<b>Flujo de CO<sub>2</sub></b>	3 g/min
<b>Co-solvente (etanol)</b>	20% v/v
<b>Intervalo de fraccionamiento</b>	F1 (0 - 9,3 min), F2 (9,3 – 12,5 min) y F3 (12,5 13,5 min)

## CONCLUSIONES





## 7. Conclusiones

Las conclusiones que derivan del trabajo realizado se pueden clasificar según los objetivos planteados.

Las conclusiones relacionadas con la producción de extractos supercríticos de romero que resultan de los trabajos presentados en esta memoria, son las siguientes:

1) Se ha escalado con éxito la cinética de extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico (sin co-solventes) desde una celda de escala de laboratorio a una celda de tamaño semi-piloto partiendo de un modelo teórico.

2) Se ha desarrollado un nuevo proceso de extracción que combina una primera etapa de fraccionamiento en línea con una segunda etapa sin fraccionamiento, que produce un extracto con alta concentración de ácido carnósico manteniendo un alto rendimiento de extracción.

3) Se ha obtenido un extracto de romero supercrítico cuya composición cumple la legislación vigente (Directiva 2010/67/EU) y puede ser utilizado como un conservante alimentario de origen natural (E-392), combinando etapas secuenciales de extracción y empleando etanol como co-solvente.

4) El empleo de cromatografía supercrítica semi-preparativa permitió la obtención de un extracto con alta capacidad antioxidante, duplicando la concentración de ácido carnósico respecto del producto de partida y con una recuperación superior al 90%.

5) Se ha purificado el ácido carnósico de los extractos supercríticos de romero con una pureza mayor a 95 % en peso y una recuperación superior al 97% mediante el empleo de la cromatografía supercrítica semi-preparativa.

Las conclusiones derivadas de la aplicación de extractos supercríticos de romero como antioxidante natural de aceites vegetales, son las siguientes:

6) Se ha demostrado el efecto del ácido carnósico presente en los extractos supercríticos de romero sobre la estabilidad oxidativa de los aceites comestibles de semilla de uva, sésamo y lino. El extracto con mayor actividad antioxidante, que además cumple con la normativa europea, puede hasta duplicar la estabilidad oxidativa de los aceites, como resultó en el aceite de lino.

7) La composición en ácidos grasos poli-insaturados de los aceites estudiados podría influir en el efecto en la estabilidad oxidativa inducida por los extractos de romero.

Finalmente, las conclusiones derivadas del estudio de los extractos de romero como antiproliferativo de células cancerígenas son las siguientes:

8) Se ha observado un efecto antiproliferativo sobre células cancerígenas hepáticas de los extractos de romero supercríticos. En general, el efecto fue mayor cuanto mayor fue la concentración de ácido carnósico en el extracto.

9) Los extractos de romero con alta concentración de ácido carnósico pero baja concentración de compuestos volátiles tienen menor efecto sobre la actividad antiproliferativa de células cancerígenas hepáticas. Esto podría indicar un efecto sinérgico del ácido carnósico y alguno/algunos de los componentes del aceite esencial.

## **BIBLIOGRAFÍA**



## 8. Bibliografía

- Abbasi, H., Rezaei, K., Radishi, L.** *Extraction of essential oils from the seeds of pomegranate using organic solvents and supercritical CO<sub>2</sub>*, Chemistry Society 85 (2008) 83.
- Abrahamsson, V., Rodriguez-Meizoso, I., Turner, C.,** *Determination of carotenoids in microalgae using supercritical fluid extraction and chromatography*, Journal of Chromatography A 1250 (2012) 63–68.
- Abramovic, H., Abram, V.** *Effect of added rosemary extract on oxidative stability of Camelina sativa oil*. Acta Agriculture Slovenica 87 (2006) 255-261.
- ACS & Livestrong.** The Global Economic Cost of Cancer. (2010)
- Aeschbach, R., Löliger, J., Scott, B. C., Murcia, A., Butler, J., Halliwell, B., Aruoma, O. I.** *Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol*, Food and Chemical Toxicology 32(1) (1994) 31-36.
- Aggarwal, B. B., Bhardwaj, A., Aggarwal, R. S., Seeram, N. P., Shishodia, S., Takada, Y.** *Role of Resveratrol in Prevention and Therapy of Cancer: Preclinical and Clinical Studies*, Anticancer Research 24 (2004) 2783-2840.
- Aghel, N., Yamini, Y., Hadjiakhoondi, A., Pourmortazavi, S. M.,** *Supercritical carbon dioxide extraction of Mentha pulegium L. essential oil*, Talanta 62 (2004) 407-411.
- Ahmed, Z., Abdeslam-Hassan, M., Ouassila, L., Danielle, B.** *Extraction and Modeling of Algerian Rosemary Essential Oil Using Supercritical CO<sub>2</sub>: Effect of Pressure and Temperature*, Energy Procedia 18 (2012) 1038-1046.
- Ahn, J., Grün, I. U., Fernando L. N.** *Antioxidant properties of natural plants extracts containing polyphenolic compounds in cooked ground beef*. Journal of Food Science 67 (2002) 1364-1369.
- Alkio, M., Harvala, T., Kompa, V.** *Preparative scale supercritical fluid chromatography, 1<sup>st</sup> Int, Symposium on Supercritical Fluids, Nice (France)*, edited by M, Perrut, ISBN 2-905267-13-5, (1988) 389-396.
- Alkio, M., Gonzalez, C., Jäntti, M., Aaltonen, O.** *Purification of Polyunsaturated Fatty Acid Esters from Tuna Oil with Supercritical Fluid Chromatography*, Journal American Oils Chemistry Society 77 3 (2000) 315-321.

- Almela, L., Sanchez-Munoz, B., Fernandez-Lopez, J. A., Roca, M. J., Rabe, V.** *Liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material*, Journal of Chromatography A, 1120 (2006) 221-229.
- Al-Sereiti, M. R., Abu-Amer, K. M., Sen, P.** *Pharmacology of rosemary (Rosmarinus officinalis Linn.) and its therapeutic potentials*. Indian Journal Experimental Biology 37 (1999) 124-130.
- Amin, A., Hamza, A. A.** *Hepatoprotective effects of hibiscus, rosmarinus and salvia on azathioprine-induced toxicity in rats*, Life Science 77 (2005) 266-278.
- Anderson, D., Cheng, Y., Duan, R. D.** *Ursolic acid inhibits the formation of aberrant crypt foci and affects colonic sphingomyelin hydrolyzing enzymes in azoxymethane-treated rats*. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology 134 (2008) 101-107.
- Arouma, O. I., Halliwell, B., Aeschbach, R., Loligers, J.** *Antioxidant and pro-oxidant properties of active rosemary constituents: Carnosol and carnosic acid*, Xenobiotica 22(2) (1992) 257-268.
- Aruoma, O. I., Spencer, J. P. E., Rossi, R., Aeschbach, R., Khan, A., Mahmood, N., Muñoz, A., Murcia, A., Butler, J., Halliwell, B.** *An evaluation of the antioxidant and antiviral action of extracts of rosemary and Provençal herbs*, Journal Food Chemistry Toxicology 34 (1996) 449-456.
- Artico, M., Di Santo, R., Costi, R., Novellino, E., Greco, G., Massa, S.** *Geometrically and conformationally restrained cinnamoyl compounds as inhibitors of HIV-1 integrase: synthesis biological evaluation, and molecular modeling*. Journal of Medicina Chemistry 41 (1998) 3948-3960.
- Ashwell M.** Conceptos sobre los alimentos funcionales. International Life Sciences Institute (ILSI) Spanish translation. Bruselas: ILSI Press. (2004).
- Azevedo, A. B. A., Kieckbush, T. G., Tashima, A. K., Mohamed, R. S., Mazzafera, P., Vieira de Melo, S. A. B.** *Extraction of green coffee oil using supercritical carbon dioxide* Journal of Supercritical Fluids 44 (2008) 186.
- Azizova, O. A.** *Role of free radical processes in the development of atherosclerosis*. Biologicheskije Membrany 19 (2002) 451-471.
- Babovic N., Djilas, S., Jadranin, M., Vajs, V., Ivanovic, J., Petrovic, S., Zizivic, I.** *Supercritical carbon dioxide extraction of antioxidant fractions from selected Lamiaceae herbs and their antioxidant capacity*, Innovative Food Science and Emerging Technologies 11 (2010) 98-117.

- Bavobic, N., Žizovic, I., Saicic, S., Ivanovic, J., Petrovic, S.** *The isolation procedure of supercritical fluid extraction of antioxidants.* Chemical Industrial Chemical Engineering 16 (2010) 287–293.
- Bakirel, T., Bakirel, U., Keles, O. U., Ulgen, S. G., Yardibi, H.** *In vivo assessment of antidiabetic and antioxidant activities of rosemary (Rosmarinus officinalis) in alloxan-diabetic rabbits,* Journal of Ethnopharmacology 116 (2008) 64-73.
- Bako, E., Deli, J., Toth, G.** *HPLC study on the carotenoid composition of Calendula products.* Journal Biochemical and Biophysical Methods 53 (2002) 241-250.
- Bamba, T., Fukusaki, E.** *Separation of hydrophobic metabolites using monolithic silica column in high-performance liquid chromatography and supercritical fluid chromatography.* Journal of Separation Science. (2009) 2699-706.
- Benkouider, C.** *The world's emerging markets, Functional Foods and Nutraceuticals* (2005)
- Bensebia, O., Barth, D., Bensebia, B., Dahmani, A.** *Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of rosemary: Effect of extraction parameters and modelling,* Journal of Supercrit Fluids 49 (2009) 161-166.
- Berger T. A., Perrut, M.** *Preparative SFC,* Journal of Chromatography 505 (1990) 37-43.
- Berger T. A., Wilson W. H.** *Separation of drugs by packed column supercritical fluid chromatography, 2, Antidepressants,* Journal of Pharmaceutical Science 83 (1994) 287-290.
- Berger, T. A.** *Packed Column SFC* RSC Chromatography Monographs, Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 1995.
- Bhoir I. C., Raman B.** *Separation and estimation seven vasodilators using packed column supercritical fluid chromatography,* Journal of Pharmaceutical Biomedecical Analysis, 17(3) (1998) 534 -546.
- Biesalski HK.** *Polyphenols and inflammation: basic interactions.* Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care 10 (2007) 724-28.
- Blum, C., Kubeczka, K., Becker, K.** *Supercritical fluid chromatography-mass spectrometry of thyme extracts (Thymus vulgaris L.),* Journal of Chromatography A 773 (1997) 377-380.
- Bocca, C., Bozzo, F., Cannito, S., Colombatto, S., Miglietta, A.** *CLA reduces breast cancer cell growth and invasion through ERalpha and PI3K/Akt pathways.* Chemical Biology Interact 183 (2010) 187–93.

- Borrás Linares, I., Arráez-Román, D., Herrero, M., Ibáñez, E., Segura-Carretero A., Fernández-Gutiérrez, A.** *Comparison of different extraction procedures for the comprehensive characterization of bioactive phenolic compounds in Rosmarinus officinalis by reversed-phase high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray time-of-flight mass spectrometry*, Journal of Chromatography A 1218 (2011) 7682–7690.
- Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik, I., Jovin, E.** *Antimicrobial and antioxidant properties of rosmarin and sage (Rosmarinus officinalis and Salvia officinalis, Lamiaceae) essential oils*, Journal. Agricultural and Food Chemistry 55 (2007) 7879-7885.
- Braga, M. E. M., Ehlert, P. A. D., Ming, L. C., Meireles, M. A. A.** *Supercritical fluid extraction from Lippia alba: global yields, kinetic data, and extract chemical composition*, Journal of Supercrit. Fluids 34 (2005) 149-156.
- Braga, P. C., Dal Sasso, M., Culici, M., Bianchi, T., Bordoni, L., Marabini, L.** *Anti-inflammatory activity of thymol: inhibitory effect on the release of human neutrophil elastase*, Pharmacology 77(3) (2006) 130-136.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C.** *Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity*, Food Science and Technology, 28 (1995) 25-30.
- Bravi, M., Spinoglio, F., Verdone, N., Adami, N., Aliboni, A., D'Andrea, A., De Santis, A., Ferri, D.** *Improving the extraction of  $\alpha$ -tocopherol-enriched oil from grape seeds by supercritical CO<sub>2</sub>, Optimisation of the extraction conditions*, Journal of Food Engineering 78 (2007) 488.
- Brieskorn, C. H., Fuchs, A., Bredenberg, J. B., McChesney, J. D., Wenkert, E.** *The structure of carnosol*, Journal of Organic Chemistry 29 (1966) 2293.
- Brunner, G., Reichmann, F.** *Process for recovering unsaturated fatty acid and derivatives thereof*, (1998) U, S, Patent 5,777,141
- Bubonja-Sonje, M., Giacometti, J., Abram, M.** *Antioxidant and antilisterial activity of olive oil, cocoa and Rosemary extract polyphenols*. Food Chemistry 127 (2011) 1821–1827.
- Bukovska, A., Cikos, S., Juhas, S., Il'kova, G., Rehak, P., Koppel, J.** *Effects of a combination of thyme and oregano essential oils on TNBS-induced colitis in mice*, Mediators Inflammation (2007) 23296.
- Burdock, G. A., Carabin, I. G., Griffiths, J. C.** *The importance of GRAS to the functional food and nutraceutical industries*. Toxicology 221 (2006) 17–27.



- Buskov S., Olsen C. E., Sorensen H., Sorensen J. C., (a).** *Supercritical fluid chromatography as basis for identification and quantitative determination of indo-3-hydroxylmethyl oligomers and ascorbigens*, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 43 (2000) 175-195.
- Buskov S., Hasselstrom J., Olsen C. E., Sorensen H., Sorensen J. C., (b).** *Supercritical fluid chromatography as a method of analysis for the determination of 4-hydroxybenzylglucosinolate degradation products*, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 43 (2000) 157-174.
- Carabias-Martínez, R., Rodríguez-Gonzalo, E., Revilla-Ruiz, P., Hernandez-Méndez, J.** *Pressurized liquid extraction in the analysis of food and biological samples*, Journal of Chromatography A 1089 (2005) 1-17.
- Careda, A., Marongiu, B., Porcedda, S., Soro, C.** *Supercritical carbón dioxide extraction and characterization of Laurus nobilis essential oil*, Journal of Agriculture Food Chemistry 50 (2002) 1492-1496.
- Carovic-Stanko, K., Orlic, S., Politeo, O., Strikic, F., Kolak, I., Milos, M., Satovic, Z.** *Composition and antibacterial activities of essential oils of seven Ocimum taxa*. Food Chemistry 119 (2010) 196-201.
- Carvalho, R. N. Jr., Moura, L. S., Rosa, P. T. V., Meireles, M. A. A.** *Supercritical fluid extraction from rosemary (Rosmarinus officinalis): Kinetic data, extract's global yield, composition, and antioxidant activity*, Journal of Supercritical Fluids 35 (2005) 197-204.
- Catalina, S. R., Karina A., Victoria R., Adrián A. V., Silvia M.** *Synergistic antioxidant and antibacterial activity of rosemary plus butylated derivatives*, FooChemistry 115 (2009) 456-461.
- Cavero, S., Jaime, L., Martín-Alvarez, P. J., Señoráns, F. J., Reglero, G., Ibáñez, E.** *In vitro antioxidant analysis of SFE extracts from rosemary (Rosmarinus officinalis L.)* Europe Food Research Technology 221 (2005) 478-486.
- Chafer, A., Fornari, T., Berna, A., Ibáñez, E., Reglero, G.** *Solubility of solid carnosic acid in supercritical CO<sub>2</sub> with ethanol as a co-solvent*, Journal of Supercritical Fluids 34 (2005) 323-329.
- Chang, C. H., Chyau, C. C., Hsieh, C. L., Wu, Y. Y., Ker, Y. B., Tsen, H. Y., Peng, R. Y.** *Relevance of phenolic diterpene constituents to antioxidant activity of supercritical CO(2) extract from the leaves of rosemary*. Natural Product Research (2008) 22 (1) 76-90.

- Chang, L. H., Shen, C. T., Hsieh, S. J., Hsu, S. L., Chang, H. C., Chang, C. M. J.** *Mycoplasmas regulate the expression of heat-shock protein genes through CIRCE-HrcA interactions*, Separator Purification and Technology 64 (2008) 213.
- Chanwitheesuk, A., Teerawutgulrag, A., Rakariyatham, N.** *Screening of antioxidant activity and antioxidant compounds of some edible plants of Thailand*. Food Chemistry 92 (2005) 491-497.
- Chemat, F., Zill-e-Huma, Khan, M. K.** *Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction*. Ultrasonics Sonochemistry 18 (2011) 813-835.
- Chester, T. L., Pinkston, J. D.** *Supercritical fluid and unified chromatography*, Analytical Chemistry 74 (2002) 2801-2812.
- Cheung, S., Tai, J.** *Anti-proliferative and antioxidant properties of Rosmarinus officinalis*, Oncology Reports, 17 (2007) 1525-1531.
- Cheyrier, V.** *Polyphenols in foods are more complex than often thought*. American Journal of Clinical Nutrition 81 (2005) 223S-229.
- Chipault, J. R., Mazumo, G. R., Hawkins, J. M., Lundberg, W. O.** *The antioxidant properties of natural spices*, Food Research 17 (1952) 46
- Coleman, K., Boutant, R., Verillon, F.** *Practical aspects of preparative supercritical fluid chromatography*, Gordon & Breach Science Publishers Uk (1999)
- Costa, S., Utan, A., Speroni, E., Cervellati, R., Piva, G., Prandini, A., Guerra, M. C.** *Carnosic acid from rosemary extracts: A potential chemoprotective agent against aflatoxin B1. An in vitro study*. Journal of Applied Toxicology 27 (2007) 152-159.
- Cuvelier, M. E., Richard, H., Berset, C.,** *Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary*, Journal American Oil Chemistry Society 73 (1996) 645-652.
- Da Porto, C., Decorti, D., Kikic, I.** *Flavour compounds of Lavandula angustifolia L to use in food manufacturing: Comparison of three different extraction methods*, Food Chemistry 112 (2009) 1072-1078.
- Damjanovic, B., Tolic, A., Lepojevic, Z.,** *Proceedings of the 8th Conference on Supercritical Fluids and Their Applications*, ISASF Nancy France (2006) 125.
- Danielski, L., Campos, M. A. S., Bresciani, L. F. V., Hense, H., Yunes, R. A., Ferreira, S. R. S.** *Marigold (Calendula Officinallis L.) oleoresin solubility in SC-CO<sub>2</sub> and composition profile*, Chemical Engineering Process 46 (2007) 99-106.

- Davarnejad, R., Kassim, K. M., Zainal, A., Sata, S. A.** *Supercritical fluid extraction of  $\beta$ -carotene from crude palm oil using CO<sub>2</sub>*, Journal Food Engineering 89 (2008) 472.
- Della Porta, G., Taddeo, R., D'Urso, E., Reverchon, E.** *Isolation of clove bud and star anise essential oil by supercritical CO<sub>2</sub> extraction*, Lebensm- Wiss. U.-Technology 31 (1998) 454-460.
- Desmortreux, C., Rothaupt, M., West, C., Lesellier, E.** *Improved separation of furocoumarins of essential oils by supercritical fluid chromatography*, Journal of Chromatography A 1216 (2009) 7088-7095.
- Díaz-Maroto, M. C., Díaz-Maroto I. J., Hidalgo, Sánchez-Palomo, E., Pérez-Coello, M. S.** *Volatile Components and Key Odorants of Fennel (Foeniculum vulgare Mill.) and Thyme (Thymus vulgaris L.) Oil Extracts Obtained by Simultaneous Distillation-Extraction and Supercritical Fluid Extraction*, Journal of Agricultural and Food Chemistry 53 (2005) 5385-5389.
- Didry, N., Dubreuil, L., Pinkas, M.** *Activity of thymol, carvacrol, cinnamaldehyde and eugenol on oral bacteria*, Pharmaceutica acta Helvetiae 69(1) (1994) 25-28.
- Dragan, T., Veličkovića, Dragan. M., Milenovića, Mihailo, S., Ristićb, Vlada. B., Veljkovićc,** *Ultrasonic extraction of waste solid residues from the Salvia sp. essential oil hydrodistillation*, Biochemical Engineering Journal 42 (2008) 97–104.
- Eileen, M., Kwee, Emily, D., Niemeyer.** *Variations in phenolic composition and antioxidant properties among 15 basil (Ocimum basilicum L.) cultivars*. Food Chemistry 128 (2011) 1044–1050.
- Eisenmenger, M., Dunford, N. T., Am, J.** *Bioactive Components of Commercial and Supercritical Carbon Dioxide Processed Wheat Germ Oil*, Journal of the American Oil Chemistty Society 85 (2008) 55.
- El A. Hayouni, I., Chraief, M., Abedrabba, M., Bouix, J. Y., Leveau, H., Mohammed, M., Hamdi, T.** *Salvia officinalis L. and Schinus molle L. essential oils: their chemical compositions and their preservative effects against Salmonella inoculated in minced beef meat*, International Journal of Food Microbiology. 125 (2008) 242–251.
- El-Ashmawy, I. M., El-Nahas, A. F., Salama, O. M.** *Protective effect of volatile oil, alcoholic and aqueous extracts of Origanum majorana on lead acetate toxicity in mice*. Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology 97 (2005) 238–43.
- Elgayyar, M., Draughon, F.A., Golden, J. R. D.A.** *Mount, Antimicrobial activity of essentials oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms*, Journal of Food Protection 64 (2001) 1019-1024.

- Erkan, N., Ayranci, G., Ayranci, E.** *Antioxidant activities of rosemary (Rosmarinus Officinalis L.) extract, blackseed (Nigella sativa L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol*, Food Chemistry 110 1 (2008) 76-82.
- Etter, S. C.** *Rosmarinus officinalis as an antioxidant*. Journal of Herbs Spices and Medicinal Plants 11 (1) (2005) 121–159.
- European Commission, Directive 2010/67/EU of 20 October 2010 amending Directive 2008/84/EC laying down specific purity criteria on food additives other than colours and sweeteners**. Off. Journal European. Communities: Legis. L 277/17-26, (2010).
- Ferley, J., Poutignat, N., Azzopard, Y., Balducci, F.** *Aromathe rapie prevantive des surinfections chez les bronchiteux chroniques: evaluation stastique en milieu institutionel: control placebo*, Phytotherapy (1988) 8-24.
- Ferreira, S. R. S., Nikolov, Z. L., Doraiswamy, L. K., Meireles, M. A. M., Petenate, A. J.** *Supercritical fluid extraction of black pepper (Piper nigrun L.) essential oil*, Journal of Supercritical Fluid 14 (1999) 235-245.
- Fornari, T., Vicente, G., Vázquez, E., R. García-Risco, M., Reglero, G.** *Isolation of essential oil from different plants and herbs by supercritical fluid extraction*, Journal of Chromatography A 1250 (2012) 34– 48.
- Fornari, T., Ruiz-Rodriguez, A., Vicente, G., Vazquez, E., Rodríguez Garcia Risco, M., Reglero, G.** *Kinetic study of the supercritical CO<sub>2</sub> extraction of different plants from Lamiaceae family*, Journal of Supercritical Fluids 64 (2012) 1– 8.
- Francisco, J. C., Jarvenpaa, E. P., Huopalahti, R., Sivik, B.** *Comparison of Eucalyptus camaldulensis Dehn. Oils from Mozambique as obtained by hydrodistillation and supercritical carbon dioxide extraction*. Journal of Agricultural Food Chemistry 49 (2001) 2339-2342.
- Francois, I., Sandra, K., Sandra, P.** *Comprehensive liquid chromatography: Fundamental aspects and practical considerations—A review*, Analytica Chimica Acta 641 (2009) 14–31
- Frankel, E. N., Huang, S. W., Aeschbach, R., Prior, E.** *Antioxidant activity of a rosemary extract and its constituents, carnosic acid, carnosol, and rosmarinic acid, in bulk oil and oil-in-water emulsion*, Journal of Agriculture Food Chemistry 44 (1996) 131–135.
- Freire, C. M. M., Marques, M. O. M., Costa, M.** *Effects of seasonal variation on the central nervous system activity of Ocimum gratissimum L. essential oil*. Journal of Ethnopharmacology 105 (2006) 161–166.

- Gamez-Meza, N., Noriega-Rodriguez, J. A., Leyva-Carrillo, L., Ortega-Garcia, J., Bringas-Alvarado, L., Garcia, H. S., Medina-Juarez, L. A.** *Antioxidant activity comparison of Thompson grape pomace extract, rosemary and tocopherols in soybean oil.* Journal of Food Processing Preservation 33 (2009) 110-120.
- García-Risco, M., Hernández Judit, E., Vicente, G., Fornari, T., Señoráns, F. J., Reglero, G.** *Kinetic study of pilot-scale supercritical CO<sub>2</sub> extraction of rosemary (Rosmarinus officinalis) leaves,* The Journal of Supercritical Fluids 55 (2011) 971-976.
- Georgantelis, D., Blekas, G., Katikou, P., Ambrosiadis, I., Fletouris, D. F.** *Effect of rosemary extract, chitosan and  $\alpha$ -tocopherol on lipid oxidation and colour stability during frozen storage of beef burgers.* Meat Science 75(2007) 256-264.
- Gerschman, R., Gilbert, D. L., Nye, S. W., Dwyer, P., Fenn, W. O.** *Oxygen poisoning and X-irradiation: a mechanism in common.* Science 119 (1954) 623.
- Ghada Al-Bandak, Efimia K. Dermesonlougrou, Petros S. Taoukis, Vassiliki Oreopoulou.** *Antioxidant effect of Majorana syriaca extract in bulk corn oil and o/w emulsion after applying high hydrostatic pressure.* Food Chemistry 125 (2011) 1166–1170.
- Ghasemi E., Raofie F., Najafi N. M.** *Application of response surface methodology and central composite design for the optimisation of supercritical fluid extraction of essential oils from Myrtus communis L. leaves.* Food Chemistry 126 (2011) 1449-1453
- Ghasemi, E., Yamini, Y., Bahramifar, N., Sefidkon, F.** *Comparative analysis of the oil and supercritical CO<sub>2</sub> extract of Artemisia sieberi.* Journal Food Engineering. 79 (2007) 306-311.
- Gibson, G. R., Roberfroid, M. B.** *Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics.* Journal of Nutrition 125 (1995) 1401–1412.
- Giddings, J. C., Myers, M. N., King, J. W.** *Dense gas chromatography at pressures to 2000 atmospheres,* Journal of Chromatography Science 7 (1969) 276.
- Gil-Ramírez, A., Mendiola, J. A., Arranz, E., Ruíz-Rodríguez, A., Reglero, G., Ibáñez, E., R. Marín, F.** *Highly isoxanthohumol enriched hop extract obtained by pressurized hot water extraction (PHWE).* Chemical and functional characterization (2012) In press.
- Giovannucci, E., Rimm, E. B., Liu, Y., Stampfer, M. J., Willett, W. C.** *A Prospective Study of Tomato Products, Lycopene, and Prostate Cancer Risk,* Journal of the National Cancer Institute 94 (5) (2002) 391-398.

- Glisic, S. B., Misic, D. R., Stamenic, D., Zizovic, I. T., Asamin, R. M., Skala, D. U.** *Supercritical carbon dioxide extraction of carrot fruit essential oil: Chemical composition and antimicrobial activity*, Food Chemistry 105 (2007) 346.
- Glisic S., Ivanovic J., Ristic M., Skala D.** *Extraction of sage (Salvia officinalis L.) by supercritical CO<sub>2</sub>: Kinetic data, chemical composition and selectivity of diterpenes* Journal of Supercritical Fluid. 52 (2010) 62-70.
- González-Vallinas, M., Molina, S., Vicente, G., De la Cueva, A., Vargas, T., Santoyo, S., R. García-Risco, M., Fornari, T., Reglero, G., Ramírez de Molina, A.** *Supercritical fluid rosemary extract exerts a beneficial effect on colon cancer progression and sensitizes to fluorouracil-based chemotherapy*, In press.
- Grassmann, J., Hippeli, S., Elstre, E. F.,** *Plant's defence mechanism and its benefits for animal and medicine: role of phenolics and terpenoids in avoiding oxygen stress.* Plant Physiology and Biochemistry 40 (2002) 471-478.
- Grosso, C., Ferraro, V., Figueiredo, A. C., Barroso, J. B., Coelho, J. A., Palabra, A. M.** *Supercritical carbon dioxide extraction of volatile oil from Italian coriander seeds.* Food Chemistry 111 (2008) 197-203.
- Guillen M. D., Manzanos M. J.** *Study of the composition of the different parts of a Spanish Thymes vulgaris L, plant*, Food chemistry 63 (1998) 373-383.
- Gupta, R. B., Shim, J. J.** *Solubility in supercritical carbon dioxide.* CRC Press Taylor and Francis Group New York, USA. 1st Edition (2007).
- Haloui, M., Louedec, L., Michel, J. B., Lyoussi, B.** *Experimentaldiuretic effects of Rosmarinus officinalis and Centauriumerythraea*, Journal Ethnopharmacology 71 (2000) 465-472.
- Hannay, J. B., Hogart, J.** *On the solubility of solids in gases*, Proceedings of the Royal Society (1879) 29-33.
- Herrero, M., Arráez-Román, D., Segura, A., Kenndler, E., Gius, B., Raggi, M. A., Ibáñez, E., Cifuentes. A.** *Pressurized liquid extraction-capillary electrophoresis-mass spectrometry for the analysis of polar antioxidants in rosemary extracts.* Journal of Chromatography A 1084 (2005) 54-62.
- Herrero, M., Cifuentes, A., Ibáñez, E.** *Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: A review*, Food Chemistry (2006) 98-136.
- Herrero, M., Mendiola, J. A., Cifuentes, A., Ibáñez E.** *Supercritical fluid extraction: recent advances and applications*, Journal of Chromatography A 1217 (2010) 2512-2520.



- Herrero, M., Plaza, M., Cifuentes, A., Ibáñez, E.** *Green processes for the extraction of bioactives from Rosemary: Chemical and functional characterization via ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and in-vitro assays.* Journal of Chromatography A 1217 (2010) 2512-2520.
- Holm, Y.** Bioactivity of basil. In R. Hiltunen & Y. Holm (Eds.). Basil: The genus *Ocimum* Amsterdam: Harwood Academic Publishers 10 (1999) 113–135.
- Hsu, C. L., Yen, G. C.** *Phenolic compounds: Evidence for inhibitory effects against obesity and their underlying molecular signaling mechanisms.* Molecular Nutrition and Food Research 52 (2008) 53-61.
- Huang, H. C., Chyau, C. C., Hsieh, C. L., Wu, Y. Y., Ker, Y. B., Tsen, H. Y., Peng, R. Y.** *Relevance of phenolic diterpene constituents to antioxidant activity of supercritical CO<sub>2</sub> extract from the leaves of rosemary,* Natural Products Research 22 (1) (2008) 76-90.
- Huang, H. C., Huang, C. Y., Lin-shiau, S. Y., Lin, J. K.** *Ursolic acid inhibits IL-1 $\beta$  or TNF- $\alpha$ -induced C6 glioma invasion through suppressing the association ZIP/p62 with PKC-zeta and downregulating the MMP-9 expression,* Molecular Carcinog 48, (2009) 517-531.
- Huang, S. C., Ho, C. T., Lin-shiau, S. Y., Lin, J. K.** *Carnosol inhibits the invasion of B16/F10 mouse melanoma cells by suppressing metalloproteinase-9 through down-regulating nuclear factor-kappa B and c-Jun,* Biochemical Pharmacology 69 (2005) 221-232.
- Hudaib, M., Speroni, E., Di Pietra, A. M., Cavrini, V.** *GC/MS evaluation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil composition and variations during the vegetative cycle,* Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 29(4) (2002) 691-700.
- Hussain, T., Gupta, S., Adhami, V. M., Mukhtar, H.** *Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate selectively inhibits COX-2 without affecting COX-1 expression in human prostate carcinoma cells.* International Journal of Cancer 113 (2005) 660-669.
- Johannsen, M., Brunner, G.** *SFC as successful tool in chemical and pharmaceutical industry.* 8<sup>th</sup> Meeting on Supercritical Fluids, Versailles (France) 2003.
- Ibáñez, E., López-Sebastián, S., Tabera, J., Reglero, G.** *Separation of carotenoids by sub-SFC with coated, packed capillary columns and neat carbón dioxide,* Journal of Chromatography A 823 (1998) 313-319.

- Ibáñez, E., Oca, A., Murga, G., López-Sebastian, S., Tabera, J., Reglero, G.** *Supercritical fluid extraction and fractionation of different preprocessed rosemary plants* Journal of Agriculture Food Chemistry 47 (1999) 1400-1404.
- Ibáñez, E., Palacios, J., Reglero, G.** *Análisis of tocopherols by on-line coupling SFE-SFC*, Journal of Microcolumn Separations 11 (1999) 605-611.
- Ibáñez, E., Kubátová, A., Señoráns, F. J., Caverro, S., Reglero, G., Hawthorne, S. B.** *Subcritical water extraction of antioxidant compounds from rosemary plants*, Journal of Agricultural and Food Chemistry 51 (2003) 375-382.
- Inatani, R., Nakatani, N., Fuwa, H., Seto, H.** *Structure of a new antioxidative phenolic diterpene isolated from Rosemary*, Agriculture Biology Chemistry 46 (1982) 1666.
- Inatani, R., Nakatani, N., Fuwa, H.** *Antioxidative of the constituents of Rosemary and their derivatives*, Agriculture Biology Chemistry 47 (1983) 521.
- Ivanovi J., Djilas S., Jadranin M., Vajs M., Anici M., Petrovi S., Zizovic, I.** *Supercritical carbon dioxide extraction of antioxidants from rosemary (Rosmarinus officinalis L.) and Sage (Salvia officinalis L.)*, Journal of Serbian Chemistry Society 74 (2009) 717-732.
- Ivanovica J., Zizovica I., Ristic M., Stamenica M., Skalaa D., J.** Supercrit. Fluid. 55 (2011) 983.
- Jago, D.** Functional foods, market trends. In Functional foods symposium, Amsterdam, Mintel. (2009)
- Kazazi, H., Rezaei, K., Javad, S., Sharif, G., Emam-Djomeh, Z., Yamini, Y.** *Supercritical fluid extraction of flavors and fragrances from Hyssopus officinalis L. cultivated in Iran*. Food Chemistry 105 (2007) 805-811.
- Kim, H. J., Min, D. B.** Chemistry of lipid oxidation. In C. Akoh, & D.B. Min (Eds.). Food Lipids: chemistry, nutrition and biotechnology (pp. 299-320). CRC Press. (2008).
- Kim, W. J., Kim, J. D., Kim, J. Oh, S. G., Lee, Y. W.** *Selective caffeine removal from green tea using supercritical carbon dioxide extraction*, Journal Food Engineering 89 (2008) 303.
- Kintzios, S.E.** Sage – the genus salvia. Amsterdam: Harwood Academic (2000).
- Kleimann, P., Finley, J. W.** Process for separation of sterol compounds from fluid mixtures using substantially insoluble compounds, (1991) U.S. Patent 5,063,070
- Klesper, E., Corwin, A. H., Turner, D. A.** *High pressure gas chromatography above critical temperatures*, Journal of Organic Chemistry 27 (1962) 700-701.



- Klicia A. S., Roberta Cerianib, S. M., Silvaa, T. T., Antonio J. A., Meirelles.** *Steam deacidification of palm oil*, Food and Bioproducts Processing 89 (2011) 383–390.
- Kokkini, S., Karousou, R., Dardioti, A., Krigas, T., N. Lanaras,** *Autumn essential oils of Greek oregano*, Phytochemistry 44 (1997) 883.
- Kotnik, P., Skerget, M., Knez, K.** *Supercritical fluid extraction of chomime flower heads. Comparison with conventional extraction, kinetics and scale-ups*, Journal of Supercritical Fluids 43 (2007) 192.
- Kris-Ethernon, P. M., Keen, C. I.** *Evidence that the antioxidant flavonoids in tea and cocoa are beneficial for cardiovascular health*. Current in Opinion Lipidology (2002) 1341-1349.
- Kritchevsky, S. B.**  *$\beta$ -carotene, carotenoids and the prevention of coronary heart disease*. Journal of Nutrition 129 (1999) 5-8.
- Leal, P. F., Queiroga, C. L., Rodrigues, M. V. N., Montanari, I., Meireles, A. M. A.** *Global yields, chemical compositions, and antioxidant activities of extracts from Achyrocline alata and Achyrocline satureioides*. Pharmacognosy Magazine, 2 (2006) 153-159.
- Lee, E., Choe, E.** *Changes in oxidation-derived off-flavor compounds of roasted sesame oil during accelerated storage in the dark*. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 1 (2012) 89-93.
- Lee, J., Scagel, C. F.** *Chicoric acid levels in commercial basil (Ocimum basilicum) and Echinacea purpurea products*. Journal of Functional Foods 2 (2010) 77–84.
- Lila, M. A.** *From beans to berries and beyond: teamwork between plant chemicals for protection of optimal human health*. Annals of the New York Academy of Science 1114 (2007) 372-80.
- Liu, X., Dong, M., Chen, X., Jiang, M., X. Lv G. Yan,** *Antioxidant activity and phenolics of an endophytic Xylaria sp. from Gingko biloba*. Journal of Food Chemistry 105 (2007) 548-554.
- Machado, D. G., Bettio, L. E., Cunha, M. P., Capra, J. C., Dalmarco, J. B., Pizzolatti, M. G., Rodriguesa, A. L. S.** *Antidepressant-like effect of the extract of Rosmarinus officinalis in mice: Involvement of the monoaminergic system*, Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry 33 (2009) 642-650.
- Majewski, W., Valery, E., Ludemann-Hombourger, O.** *Principle and applications of supercritical fluid chromatography*, Journal of Liquid Chromatography Related Technologies 28 (2005) 1233–1252.

- Makinen-Aakula, M.** Trends in functional foods dairy market. In Proceedings of the third functional food net meeting. (2006).
- Manach, C., Mazur, A., Scalbert, A.** *Polyphenols and prevention of cardiovascular disease*. Current in Opinion Lipidology 17 (2005) 77-84.
- Martín, D., Terrón, A., Fornari, T., Reglero, G., Torres, C. F.** *Oxidative stabilization of ultra-high omega-3 concentrates as ethyl esters or triacylglycerols*, Food Research International 45 1 (2012) 336-341.
- Martinez, A. L., Gonzalez-trujano, M. E., Pellicer, F., Lopez-Munoz, F. J., Navarrete, A.** *Antinociceptive effect and GC/MS analysis of Rosmarinus officinalis L. essential oil from its aerial parts*, Planta Medica 75 (2009) 508-511.
- Martinez, M. L., Mattea, M. A., Maestri, D. M.** *Pressing and supercritical carbon dioxide extraction of walnut oil*, Journal of Food Engineering 88 (2008) 399.
- Mastelic, J., Jerkovic, I., Blazevic, I., Poljak-Blazi, M., Borovic, S., Ivancic-Bace, I., Smrecki, V., Zarkovic, N., Brcic-Kostic, K., Vikic-Topic, D., Müller, N.** *Comparative Study on the Antioxidant and Biological Activities of Carvacrol, Thymol, and Eugenol Derivatives*, Journal of Agricultural and Food Chemistry 56 (11) (2008) 3989-3996.
- Meghwal, M., Goswami, T. K.** *Cryogenic grinding of spices is a novel approach whereas ambient grinding needs improvement*, Continental Journal Food Science and Technology 4 (2010) 24-37.
- Menaker, A., Kravets, M., Koel, M., Orav, A.** *Identification and characterization of supercritical fluid extracts from herbs*, Comptes Rendus Chimie 7 (2004) 629–633.
- Mitra, P., Ramaswamy, G. S., Chang, K. S. J.** *Pumpkin (Cucurbita maxima) seed oil extraction using supercritical carbon dioxide and physicochemical properties of the oil*, Food Engineering 95 (2009) 208.
- Mohammad, B. H., Dilip, K. R., Nigel, P., Brunton, Ana Belen, M. D. Catherine Barry-Ryan,** *Characterization of Phenolics Composition in Lamiaceae Spices by LC-ESI-MS/MS*, Journal Agriculture of. Food Chemistry 58 (19) 2010 10576–10581.
- Moldao-Martins, M., Palavra, A., Beirao da Costa, M. L., Bernardo-Gil, M. G.,** *Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of Thymus zygis L. subsp. sylvestris aroma*, Journal of Supercritical Fluids 18 (2000) 25–34.
- Montañés, F., Corzo, N., Olano, A., Reglero, G., Ibañez, E., Fornari, T.** *Selective fractionation of carbohydrate complex mixtures by supercritical extraction with CO<sub>2</sub> and different co-solvents* J, Supercrit,Fluids 45 (2008) 189,

- Montañés, F., Fornari, T., Martin-Alvarez, P. J., Montilla, A., Corzo, N., Olano, A. Ibañez, E.,** *Selective fractionation of disaccharide mixtures by supercritical CO<sub>2</sub> with ethanol as co-solvent*, Journal of Supercritical Fluids 41 (2007) 61.
- Montañés, F., Olano, A., Reglero, G., Ibañez, E., Fornari, T.** *Supercritical technology as an alternative to fractionate prebiotic galactooligosaccharides* Separation and Purification Technology 66 (2009) 383.
- Mookherjee, B. D., Wilson, R. A., Trenkle, R. W., Zampino, M. J., Sands, K. P.** Flavor Chemistry: Trends and Developments. In ACS Symposium Series, Washington, 176. (1989).
- Moran, A. E., Carothers, A. M., Weyant, M. J., Redston, M., Bertagnolli, M. M.** *Carnosol inhibits beta-catenin tyrosine phosphorylation and prevents adenoma formation in the C57BL/6J/Min/+ (Min/+) mouse*. Cancer Research 65 (2005)1097-104.
- Mukhopadhyay, R.** *SFC: embraced by industry and spurned by academia*, Analytical Chemistry 80 (2008) 3091–3094.
- Murga, R., Sanz, M. T., Beltran, S., Cabezas, J. L.** *Solubility of some phenolic compounds contained in grape seeds, in supercritical carbon dioxide*, Journal of Supercritical Fluids 23 (2002) 113-121.
- Naasani, I., Oh-Hashi, F., Oh-Hara, T., Feng, W. Y., Johnston, J., Chan, K., Tsuruo, T.** *Blocking telomerase by dietary polyphenol is a major mechanism for limiting the growth of human cancer cells in vitro and in vivo*. Cancer Research 63 (2003) 824-830.
- Naciye, E., Guler, A., Erol, A.** *Antioxidant activities of rosemary (Rosmarinus Officinalis L.) extract, blackseed (Nigella sativa L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol*, Food Chemistry 110 (2008) 76–82.
- Nakatani, N., Inatani, R.** *Two antioxidative diterpenes from Rosemary and a revised structure for rosmarol*, Agricultural and Biological Chemistry 48 (1984) 2081.
- Napoli, M.E., Curcuruto, G., Ruberto, G.** *Sereneing of the essential oil composition of wild Sicilian rosemary*, Biochemical Systematics and Ecology 38 (2010) 659–670.
- Narayanana, B. A., Geoffroya, O., Willingham, M. C., Reb, G. G., Nixon, D. W.** *Expression and its possible role in G1 arrest and apoptosis in ellagic acid treated cancer cells*. Cancer Letters 136 (1999) 215–221.

- Navarro, V., Fernandez-Quintela, A., Churruca, I., Portillo, M. P.** *The body fatlowering effect of conjugated linoleic acid: a comparison between animal and human studies.* Journal Physiology Biochemical 62 (2006) 137–47.
- Ngo, S. N. T., Williams, D. B., Head R. J.** *Rosemary and Cancer Prevention: Preclinical Perspectives,* Critical Reviews in Food Science and Nutrition 51 10 (2011) 946-954.
- Nissen, L. R., Mansson, L., Bertelsen, G., Tuong, H. B., Skibsted, L. H.** *Protection of dehydrated chicken meat by natural antioxidants as evaluated by electron spin resonance spectrometry.* Journal Agriculture Food Chemistry 48 (2000) 5548-5556.
- Oca, E., Ibanez, A., Murga, G., Sebastian, S. L. D., Tabera, J., Reglero, G.** *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 47 (1999) 1400.
- Offord, E. A., Mace, K., Ruffieux, C., Malnoe, A., Pfeifer, A. M. A.** *Rosmary components inhibit benzo[a]pyrene-induced genotoxicity in human bronchial cells,* Carcinogenesis 16 (1995) 2057–2062.
- Ouwehand, A.** Success in applying pro- and prebiotics in dairy products. In Proceedings of the fourth international FFNet meeting on functional foods. (2007).
- Özbek, T., Güllüce, M., Sahin, F., Özkan, H., Sevsay, S., Baris, Ö.** *Investigation of the antimutagenic potentials of the methanol extract of Origanum vulgare L. Subsp. vulgare in the Eastern Anatolia region of Turkey.* Turkish Journal of Biology 32 (2008) 271–276.
- Ozcan, M.** *Antioxidant activities of rosemary, sage, and sumac extracts and their combinations on stability of natural peanut oil.* Journal Medical Food 6 (2003) 267-270.
- Paniwnyk, L., Cai, H., Albu, S., Mason, T.J., Cole. R.** *The enhancement and scale up of the extraction of anti-oxidants from Rosmarinus officinalis using ultrasound,* Ultrasonics Sonochemistry 16 (2009) 287–292.
- Patel, R. N., Bandyopadhyay, S., Ganesh, A.,** *Extraction of cashew (Anacardium occidentale) nut shell liquid using supercritical carbon dioxide,* Bioresource Technology 97 (2006) 847-853.
- Pavela, R.** *Insecticidal and repellent activity of selected essential oils against of the pollen beetle, Meligethes aeneus (Fabricius) adults,* Industrial Crops and Products 34 (2011) 888– 892.

- Pérez-Fons, L., Garzón, T., María, V.** *Relationship between the antioxidant capacity and effect of Rosemary (Rosmarinus officinalis L.) polyphenols on membrane phospholipid order*, Journal of Agricultural Food Chemistry 58 (2010) 161-171.
- Perretti, G., Motori, A., Bravi, E., Favati, F., Montanari, L., Fantozzi, P.** *Supercritical carbon dioxide fractionation of fish oil fatty acid ethyl esters*, Journal of Supercritical Fluids 40 (2007) 349.
- Petersen, M., Simmonds, M. S. J.** *Rosmarinic acid*, Phytochemistry 62 2 (2003) 121-125.
- Pettinello G., Bertucco A., Pallado P., Stassi A.** *Production of EPA enriched mixtures by supercritical fluid chromatography: from the laboratory scale to the pilot plant* Jornaol of Supercritical Fluids 19 (2000) 51-60.
- Posadas, S. J., Caz, V., Largo, C., De la Gandara, B., Matallanas, B., Reglero, G., De Miguel, E.** *Protective effect of supercritical fluid rosemary extract, Rosmarinus officinalis, on antioxidants of major organs of aged rats*. Experimental Gerontology 44 (2009) 383-389.
- Pourmortazavi, S. M., Hajimirsadeghi, S. S.** *Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis*. Journal of Chromatography A 1163 (2007) 2-24.
- Prakash, V.** Leafy Spices, CRC Press, Boca Raton, FL, 99. (1990)
- Priestley, C. M., Williamson, E. M., Wafford, K. A., Sattelle, D. B.** *Thymol, from thyme essential oil, is a positive allosteric modulator of human GABA-A receptors and a homo-oligomeric insect GABA receptor from Drosophila melanogaster*. British Journal Pharmacology 140 (2003) 1363-1372.
- Pyo, D.** *Separation of vitamins by SFC with water-modified dioxane as the mobile phase*, Journal Biochemical and Biophysical Methods 43 (2000) 113-123.
- Rac, M., Ostric-Matijasevic, B.** *The properties of rosemary as an antioxidant*, Review Fr. Corps Gras 2 (1955) 796.
- Ramalho, V. C., Jorge, N.** *Antioxidant action of Rosemary extract in soybean oil submitted to thermoxidation*. Grasas y Aceites 59 (2008) 38-41.
- Ramírez, P., Señorans, F.J., Ibañez, E., Reglero, G.** *Separation of Rosemary antioxidant compounds by supercritical fluid chromatography on coated packed capillary columns*, Journal of Chromatography A 1057 (2004) 241-245
- Ramírez, P., Fornari, T., Señorans, F.J., Ibañez, E., Reglero, G.** *Isolation of phenolic antioxidant compounds by SFC*, Journal of Supercritical fluids 35 (2006) 128-132.

- Ramírez, P., García-Risco, M., Santoyo, S., Señorans, F.J., Ibañez, E., Reglero, G.** *Isolation of functional ingredients from Rosemary by preparative-supercritical fluid chromatography (Prep-SFC)*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 41 (2007) 1606-1613
- Reglamento (CE) nº 1924/2006 del Parlamento Europeo y de Consejo relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos.** Diario Oficial de la Unión Europea 30/12/2006.
- Reverchon, E.** *Fractional separation of SCF extracts from marjoram leaves: Mass transfer and optimization*, Journal of Supercritical Fluid. 5 (1992) 256-261.
- Reverchon, E., Sanatore, F.** *Isolation of rosemary oil: comparison between hydrodistillation and supercritical CO<sub>2</sub> extraction*, Flavour and Fragrance Journal 7 (1992) 227-230.
- Reverchon, E., Ambruosi, A., Sanatore, F.** *Isolation of peppermint oil using supercritical CO<sub>2</sub> extraction*, Flavour Fragrance Journal (1994) 9-19.
- Reverchon, E., Taddeo, R., Della Porta, G.** *Extraction of Sage Oil by Supercritical CO<sub>2</sub>: Influence of Some Process Parameters*, Journal of Supercrit Fluids 8 (1995) 302-309.
- Reverchon, E., Della Porta, G.** *Rose concrete fractionation by supercritical CO<sub>2</sub>*, Journal of Supercritical Fluid 9 (1996) 199-204.
- Reverchon, E., De Marco, I.** *Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter*, Journal of Supercrit Fluids 38 (2006) 146-166.
- Richter, B. E., Jones B. A., Ezzell, J. L., Porter, N. L., Avdalovic, N., Pohl, C.** *Accelerated solvent extraction: a technique for sample preparation*. Analytical Chemistry 68 (1996) 1033-1039.
- Riera, E., Blanco, A., García, J., Benedito, J., Mulet A., Gallego-Juárez, J. A., Blasco, M.** *High-power ultrasonic system for the enhancement of mass transfer in supercritical CO<sub>2</sub> extraction processes*. Physics Procedia 3 (2010) 141-146.
- Riznar, K., Celan, S., Knez, Z., Mojca, S., Bauman, D., Glaser, R. Glaser,** *Antioxidant and antimicrobial activity of rosemary extract in chicken frankfurters*. Journal of Food Science 71 (2006) 425-429
- Rizner-Hras, A., Hadolin, M., Knez, Z., Bauman, D.** *Comparison of antioxidative and synergistic effects of Rosemary extract with  $\alpha$ -tocopherol, ascorbyl palmitate and citric acid in sunflower oil*. Food Chemistry 71 (2000) 229-233.



- Robards, K., Antolovich, M.** *Analytical chemistry of fruit Bioflavonoids*, Review Analyst 122 (1997) 11-34.
- Rodrigues, M. R. A., Caramão, E. B., Dos Santos, J. G., Dariva, C., Oliveira, J. V.** *The effects of temperature and pressure on the characteristics of the extracts from high-pressure CO<sub>2</sub> extraction of Majorana hortensis Moench*, Journal of Agriculture Food Chemistry 51 (2003) 453-456.
- Rodrigues, V. M., Rosa, P. T. V., Marques, M. O. M., Petenate, A. J., Meireles, M. A. A.** *Supercritical extraction of essential oil from Aniseed (Pimpinella anisum L.) using CO<sub>2</sub>: solubility, kinetics and composition data*, Journal of Agriculture Food Chemistry 51 (2003) 1518-1523.
- Roula, M., Abdel-Massih, Rida, F., Samer, B., Nisrine E., Elias, B.** *The apoptotic and anti-proliferative activity of Origanum majorana extracts on human leukemic cell line*. Leukemia Research 34 (2010) 1052-1056.
- Sadik, C. D., Sies, H., Schewe, T.** *Inhibition of 15-lipoxygenases by flavonoids: structure-activity relations and mode of action*. Biochemical Pharmacology 65 (2003) 773-781.
- Saito, M., Yamauchi, Y., Okuyama, T.** *Fractionation by packed column SFC and SFE. Principals and applications*, VCH Publishers INC. New York 1994.
- Salimi, A., Fatemi, S., Nei Nei, H. Z., Safaralie, A.** *Mathematical Modeling of Supercritical Extraction of Valerenic Acid from Valeriana officinalis L*, Chemistry. Engineering of Technology 31 (2008) 1470
- Sanchez-Vicente, Y., Cabañas, A., Renuncio, J. A. R., Pando, C.** *Supercritical fluid extraction of peach (Prunus persica) seed oil using carbon dioxide and ethanol*, Journal of Supercritical Fluids 49 (2009) 167.
- Sari, M., Biondi, D. M., Kaabeche, M., Mandalari, G., D'Arrigo, M., Bisignano, G.** *Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of several populations of Algerian Origanum glandulosum Desf.* Flavour and Fragrance Journal 21 (2006) 890-8.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Remesy, C., Jimenez, L.** *Dietary polyphenols and the prevention of diseases*. Critical Reviews Food Science and Nutrition 45 (2005) 287-306.
- Schoenmarkers, P. J., Uunk, L. G. M.** *Supercritical fluid chromatography. Recent and future developments*. Europ. Chromatogr. News, 1 (1987), 14-22.

- Schwarz K., temes W.** *Antioxidative constituents of Rosmarinus officinalis and Salvia officinalis. II Isolation of carnosic acid and formation of other phenolic diterpenes.* Z. Lebensm. Unters. Forsch. 195, (1992) 95.
- Schwarz, K., Ternes, W., Schmauderer, E.** *Antioxidative constituents of Rosmarinus officinalis and Salvia officinalis III. Stability of phenolic diterpenes of rosemary extracts under termal stress as required for technological process.* Z. Lebensm. Unters. Forsch. 195 (1992) 104-107.
- Schwartz, H., Ollilainen, V., Piironen, V., Lampi, A.** *Tocopherol, tocotrienol and plant sterol contents of vegetable oils and industrial fats* Journal of Food Composition Analitical 21 (2008) 152-161.
- Sebastian, S. L., Ramos, E., Ibañez, E., Bueno, J. M., Ballester, L., Tabera, J., Reglero, G.** *Dearomatization of antioxidant rosemary extracts by treatment with supercritical carbon dioxide,* Journal of Agricultural and Food Chemistry 47 (1998) 13-19.
- Sebranek, J. G., Sewalt, V. J. H., Robbins, K. L., Houser, T. A.** *Comparison of a natural rosemary extract and BHA/BHT for relative antioxidant effectiveness in pork sausage,* Meat Science 69 (2005) 289-296.
- Segvi Klari, M., Kosalec, I., Masteli, J., Piecková, E., Pepeljnak, S.** *Antifungal activity of thyme (Thymus vulgaris L.) essential oil and thymol against moulds from damp dwellings,* Letters in Applied Microbiology 44(1) (2007) 36-42.
- Sesti-Osseo, L., Caputo, G., Gracia, I., Reverchon, E.** *Continuos fractionation of fried oil bay supercritical CO<sub>2</sub>.* 8<sup>th</sup> Meeting on Supercritical Fluids, Versailles (france), 2003.
- Shi, J., Yi, C., Xue, S. J., Jiang, Y., Ma, Y., Li, D.** *Effects of modifiers on the profile of lycopene extracted from tomato skins by supercritical CO<sub>2</sub>,* Journal of Food Engineering 93 (2009) 431.
- Shi, J., Yi, C., Xue, S. J, Jiang, Y., Ma, Y., Li, D.** *Effects of supercritical CO<sub>2</sub> fluid parameters on chemical composition and yield of carotenoids extracted from pumpkin,* Food Science and Technology 43 (2010) 39.
- Shia, J., Mittal, G., Kimb, E., Xue. S.** *Solubility of carotenoids in supercritical CO<sub>2</sub>,* Journal of Food Review International 23 (2007) 341-371.
- Sie, S. T., Rijnders, G. W. A.** *High-pressure gas chromatography and chromatography with supercritical fluids. II. Permeability and efficiency of packed columns with high-pressure gases as mobile phases under conditions of incipient turbulence,* Journal of Separation Science 2 (1967) 699.



- Simandi, B., Oszagyan, M., Lemberkovics, E., Kery, A., Kaszacs, J., Thyron, F., Matyas, T.** *Supercritical carbon dioxide extraction and fractionation of oregano oleoresin*, Food Research International 31 (1998) 723-728.
- Singh, K. K., Goswami, T. K.**, *Studies on cryogenic grinding of spices*. IIT Kharagpur
- Siro, I., Kapolna, E., Kapolna, B., Lugasi, A.** *Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance*. A review Appetite 51 (2008) 456-467.
- Slattery, M. L., Benson, J., Curtin, K., Ma, K. N., Schaeffer, D., Potter, J. D.** *Carotenoids and colon cancer*. American Journal of Clinical Nutrition 71 (2000) 575-582.
- Smith, R. M.** *Supercritical fluids in separation science-the dreams, the reality and future*, Journal of Chromatography A, 856 (1999) 83-115.
- Sokovic, M., Tzakou, O., Pitarokili, D., Couladis, M.** *Antifungal activities of selected aromatic plants growing wild in Greece*, Molecular Nutrition Food Research, Nahrung/Food 46 (2002) 317-320.
- Soliman, K. M., Badeaa R. I.** *Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi*, Food and Chemical Toxicology 40(11) (2002) 1669-1675.
- Sovová, H.** *Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO<sub>2</sub>—I. Modelling of extraction curves*, Chemical Engineering Science 49 3 (1994) 409-414.
- Stashenko, E. E., Jaramillo, B. E., Martinez, J. R.** *Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of Lippia alba (Mill.) N.E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its in vitro antioxidant activity*. Journal of Chromatography A 1025 (2004) 93-103.
- Sugihara, N., Kanda, A., Nakano, T., Nakamura, T., Igusa, H., Hara, S.** *Novel Fractionation Method for Squalene and Phytosterols Contained in the Deodorization Distillate of Rice Bran Oil*, Journal of Oleo Science 59 (2010) 65-70
- Sugiyama, K., Saito, M., T.Hondo, T., Senda, M.** *New double-stage separation analysis method: Directly coupled laboratory-scale supercritical fluid extraction—supercritical fluid chromatography, monitored with a multiwavelength ultraviolet detector*, Journal of Chromatography A 32 (1985) 107-116.
- Suhaj, M.** *Spice antioxidants isolation and their antiradical activity: a review*, Journal of Food Composition and Analysis 19 (2006) 531-537.

- Suong, N. T., Desmond, B., Williams, Richard, J. H.** *Rosemary and Cancer Prevention: Preclinical perspective*. Critical Reviews in food Science and Nutrition, 51 (2011) 946-954.
- Suppakul, P., Miltz, J., Sonneveld, K., Bigger, S. W.** *Antimicrobial properties of basil and its possible application in food packaging*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51 (2003) 3197–3207.
- Suzuki, Y., Furuta H.** *Stimulation of guinea pig neutrophil superoxide anion-producing system with thymol*, Inflammation 12(6) (1988) 575-584.
- Szumny, A., Figiel, A., Gutierrez-Ortiz, A., Carbonell-Barrachina, A.A.** *Composition of rosemary essential oil (Rosmarinus officinalis) as affected by drying method*, Journal and Food Engineering 97 (2010) 253-260.
- Tavassoli, S., Emam, D. Z.** *Total Phenols, Antioxidant Potential and Antimicrobial Activity of Methanol Extract of Rosemary (Rosmarinus officinalis L.)*, Global Veterinaria 7 (2011) 337-341.
- Taylor, S. L., King, J. W.** *Preparative-scale SFE/SFC of corn bran*, Journal of American Oil Chemistry Society 79 (2002) 1133-1136
- Terpinc, P., Bezjak, M., Abramovic, H.** *A kinetic model for evaluation of the antioxidant activity of several rosemary extracts*. Food Chemistry 115 (2009) 740-744.
- Thongtan, K., Toma, R., Reiboldt, W., Daoud, A. Z.** *Effect of rosemary extract on lipid oxidation and sensory evaluation of frozen, precooked beef patties*, Foodservice Research International 16 (2005) 93-104.
- Thorsen, M. A., Hildebrandt, K. S.** *Quantitative determination of phenolic diterpenes in rosemary extracts. Aspects of accurate quantification*. Journal of Chromatography A 995 (2003) 119-125.
- Tian, H., Lai, D. M.** *Analysis on the volatile oil in Origanum vulgare*. Zhongyaocai, Journal of Chinese Medicinal Materials 29(9) (2006) 920-921.
- Toribio, L., Nozal, M. J., Bernal, J. L., Nieto, E. M.** *Use of semipreparative supercritical fluid chromatography to obtain small quantities of the albendazole sulfoxide enantiomers*, Journal of Chromatography A 1011 (2003) 155-161.
- Turner, C., King, J.W., Mathiasson, L.** *SFE and SFC for fat-soluble vitamin analysis*, Journal of Chromatography A 936 (2001) 215-237.

- Vagi, E., Simandi, B., Vasarhelyine, K. P, Daood, H., Kery, A., Doleschall, F., Nagy, B.** *Supercritical carbon dioxide extraction of carotenoids, tocopherols and sitosterols from industrial tomato by-products*, Journal of Supercritical Fluids 40 (2007) 218.
- Vainio, H., Weiderpass, E.** *Fruit and vegetables in cancer prevention*. Nutrition Cancer 54 (2006) 111-42
- Vicente G., García-Risco M.R., Fornari T., Reglero G.** *Supercritical Fractionation of Rosemary Extracts to Improve the Antioxidant Activity*, Chemical Engineering Technology 35 (2012) 176-182.
- Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L., Bates D.** *Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry — A review*, Innovative Food Science Emery 9 (2008) 161-169.
- Vinatoru, M.** *An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs*, Ultrasonics Sonochemistry 8 (2001) 301-313.
- Visentin, A., Rodríguez-Rojo, S., Navarrete, A., Maestri, D., Cocero. M. J.** *Precipitation and encapsulation of rosemary antioxidants by supercritical antisolvent process*. Journal of Food Engineering 109 (2012) 9–15.
- Visioli, F., Colombo, C., Galli, C.** *Oxidation of individual fatty acids yields different profiles of oxidation markers*. Biochemistry Biophysical Research 245 (1998) 487-489.
- Voutilanien, S. Nurmi, T., Mursu, T., Rissanene. T. H.** *Carotenoids and cardiovascular health*, The American Journal of Clinical nutrition 83 (2006) 1265-1271.
- Weckesser, S., Engel, K., Simon-Haarhaus, B., Wittmer, A., Pelz, K., Schemppa, C. M.** *Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeasts with dermatological relevance*, Phytomedicine 14 (2007) 508–516.
- Welch, C. W., Leonard, W. R., DaSilva, J. O., Baba, M., Albaneze-Walker, J., Henderson, D. W., Laing, B., Mathre, D. J.** *Preparative chiral SFC as a green technology for rapid access to enantiopurity in pharmaceutical process research*, LC-GC 23 (2005) 16–29.
- Wu, J. J., Lin, J. C., Wang, C. H., Jong, T. T., Yang, H. L., Hsu, S. L., Chang, C. m. J.** *Extraction of antioxidative compounds from wine lees using supercritical fluids and associated anti-tyrosinase activity*, Journal of Supercritical Fluids 50 (2009) 33.

- Wu, J. W., Lee, M. H., Ho, C. T., Chan, S. S.** *Elucidation of the chemical structures of antioxidants isolated from rosemary*, Journal of American Oil Chemist Society 59 (1982) 339.
- Yamauchi, y., Saito M.** *Fractionation of lemon peel oil by semi-preparative supercritical fluid chromatography*, Journal of Chromatography 505 (1990) 237-246.
- Yamini, Y., Khaje,h M., Ghasemi, E., Mirza, M., Javidnia, K.** *Comparison of essential oil compositions of Salvia mirzayanii obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods*. Food Chemistry 108 (2008) 341–346
- Yesil-Celiktas, O., Sevimli, C., Bedir, E., Vardar-Sukan, F.** *Inhibitory effects of rosemary extracts, carnosic acid and rosmarinic acid on the growth of various human cancer cell lines*. Plant Foods Human Nutrition 65 (2010) 158-63.
- Yesil-Celiktas, O., Isleten, M., Karagul-Yuceer, Y., Bedir, E., Vardar-Sukan, F.** *Influence of supercritical carbon dioxide and methanolic extracts of rosemary on oxidation and sensory properties of wheat germ oil*. J. Food Qual. 32 (2009) 709-724.
- Yesil-Celiktas, O., Otto, F., Parlar, H.** *A comparative study of flavonoid contents and antioxidant activities of supercritical CO<sub>2</sub> extracted pine barks grown in different regions of Turkey and Germany*. European Food Research and Technology 229 (2009) 671.
- Yesil-Celiktas, O. Y., Bedir, E., Vardar, Sukan, F.,** *In vitro antioxidant activities of Rosmarinus officinalis extracts treated with supercritical carbon dioxide*, Food Chemistry 101 (2007) 1474-1481.
- Young, I. S., Woodside, J. V.** *Antioxidants in health and disease*. Journal of Clinical Pathology 54 (2001) 176–186.
- Yuen, M. C., Ah, N. M., Yahaya, H., Yamauchi, Y., Bounoshita, M., Saito, M.** *Separation of crude palm oil components by semipreparative supercritical fluid chromatography*. J. American Oil Chemist Society, 73 (1996), 523
- Zaouali, Y., Bouzaine, T., Boussaid, M.** *Essential oils composition in two Rosmarinus officinalis L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities*. Food and Chemical Toxicology 48 (2010) 3144–3152.
- Zaveri, N. T.** *Green tea and its polyphenolic catechins: Medicinal uses in cancer and noncancer applications*, Life Sciences 78 (2006) 2073–2080.

- Zegura, B., Dobnikb, D., Niderlc, M. H., Filipi. M.** *Antioxidant and antigenotoxic effects of Rosemary (Rosmarinus officinalis L.) extracts in Salmonella typhimurium TA98 and HepG2 cells.* Environmental toxicology and pharmacology 3 2 (2011) 296–305.
- Zekovic, Z., Lepojevic, Z., Vujic, Dj.** *Supercritical Extraction of Thyme (Thymus vulgaris L.),* Chromatographia 51 (2000) 175–179.
- Zhang, X., Gao, H., Zhang, L., Liu, D., Ye, X,** *Extraction of essential oil from discarded tobacco leaves by solvent extraction and steam distillation, and identification of its chemical composition,* Industrial Crops and Products 39 (2012) 162–169.
- Zizovic, I., Stamenic, M., Ivanovic, J., Orlovic, A., Ristic, M., Djordjevic, S., Petrović, S. D., Skala, D.** *Supercritical carbon dioxide extraction of sesquiterpenes from valerian root.,* Journal of Supercrit Fluids 43 (2007) 249-258.
- Zoran P., Zekovic., Zika, D., Lepojevic., Svetlana, G., Milosevic., Aleksandar, S. Tolic.** *Modeling of the Thyme-Liquid carbon dioxide extraction system,* APTEFF 34 (2003) 1-148.
- Zosel, K. O. R.** (1974). *Process for recovering caffeine.* United States, Patente: US3806619
- Zuo, Y. B., Zeng, A. W., Yuan, X. G., Yu, K. T.** *Extraction of soybean isoflavones from soybean meal with aqueous methanol modified,* Journal of supercritical carbon dioxide Food Engineering 89 (2008) 384.



## **ANEXO: OTRAS PUBLICACIONES**





## **9. Anexo: Otras publicaciones**

**9.1 Kinetic study of the supercritical CO<sub>2</sub> extraction of different plants from lamiacea family**

**9.2 Isolation of essential oil from different plants and herbs by supercritical fluid extraction**

**9.3 Liquid-liquid equilibria for separation of tocopherol from olive oil using ethyl lactate**